

Auswirkungen von maternalem Stress während der frühen und späten Gestation und synthetischen Glucocorticoiden auf die Entwicklung der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse des Schafes

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Vilmar Frauendorf

geboren am 23.10.1983 in Neuhaus am Rennweg

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Matthias Schwab / Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. vet. habil. Dr. sc. vét. Petra Reinhold / Friedrich – Loeffler – Institut Jena
3. Prof. Dr. med. Reinhard Bauer / Universitätsklinikum Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.07.2013

Verwendete Abkürzungen und Bezeichnungen

ACTH	adrenocorticotrophes Hormon
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung
AUC	Fläche unterhalb der Kurve
BM	Betamethason
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CDI	Children's Depression symptoms Inventory
CRH	Cortico-Releasing-Hormon
dGA	Schwangerschaftstag
FBP	fetaler Blutdruck
FHR	fetale Herzfrequenz
GC	Glucocorticoide
GR	Glucocorticoidrezeptor
HHN-Achse/HPAA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
11- β -HSD2	11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ-2
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MR	Mineralocorticoidrezeptoren
MW	Mittelwert
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
n	Anzahl der Tiere
NNP	Natrium-Nitroprussid
PMS	pränataler maternaler Stress
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RIA	Radioimmunassay
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SO ₂	Sauerstoffsättigung
SST	Schwangerschaftstag
SSW	Schwangerschaftswoche

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Konzept der fetalen Programmierung von Erkrankung im späteren Leben	3
2.2 Pränataler Stress und die Programmierung von neuropsychiatrischen Erkrankungen	3
2.2.1 Depressionen	4
2.2.2 Kognitive Verhaltensauffälligkeiten	5
2.2.3 Autismus	5
2.2.4 Schizophrenie	6
2.3 Auswirkungen synthetischer Glucocorticoide auf die fetale Entwicklung	6
2.4 Mechanismen der Programmierung neuropsychiatrischer Erkrankungen	7
2.4.1 Übertragungswege von maternalen Stress auf den Fetus	7
2.4.2 Physiologie und Reifung der fetalen HHN – Achse	8
2.5 Programmierung der Aktivität der fetalen HHN – Achse	11
3 Ziele der Arbeit	13
4 Originalpublikation: Effects of early and mid-gestational prenatal stress and synthetic glucocorticoids on development of the fetal hypothalamic – pituitary – adrenal axis in sheep	15
<p>Florian Rakers, Vilmar Frauendorf, Sven Rupprecht, Rene Schiffner, Sabine J. Bischoff, Michael Kiehnopf, Petra Reinhold, Otto W. Witte, Harald Schubert, Matthias Schwab</p> <p><i>Stress – The international Journal on the Biology of Stress; Early online, 1-8, 2012</i></p>	
5 Diskussion	23
5.1 Methodische Betrachtungen	23
5.1.1 Das fetale Schaf als geeignetes experimentelles Tiermodell	23
5.1.2 Isolation als Stressparadigma	23

5.1.3 Testung der HHN-Achse mit Hilfe einer medikamentös induzierten Hypotonie	24
5.2 Auswirkungen von pränatalem Stress auf die fetale HHN – Achse	25
5.3 Auswirkungen von synthetischen Glucocorticoiden auf die fetale HHN – Achse	28
5.4 Vulnerable Zeitfenster während der fetalen HHH – Achse	28
6 Schlussfolgerungen	30
7 Literatur- und Quellenverzeichnis	32
Anhang	46
Ehrenwörtliche Erklärung	46
Danksagung	47

1 Zusammenfassung

Pränataler Stress hat eine hohe klinische Relevanz, da etwa 25 % aller Schwangeren an dauerhaftem, psychosozialen Stress leiden. Erhöhte Cortisolspiegel während der Schwangerschaft, wie sie bei maternalem Stress auftreten, führen zu einer anhaltenden Programmierung der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse), welche im zweiten und dritten Trimenon reift. Der Grund hierfür ist eine Desensitivierung der in die negative Rückkopplung involvierten Glucocorticoidrezeptoren. Eine hyperreaktive HHN-Achse ist beim Menschen wiederum mit einer Vielzahl von Erkrankungen, z. B. Depressionen, kognitiven Verhaltensauffälligkeiten, arteriellen Bluthochdruck und Diabetes assoziiert. Unklar ist bisher jedoch, in welchen Zeiträumen eine besondere Vulnerabilität gegenüber pränatalem maternalem Stress besteht.

Am trächtigen Schaf, dem allgemein gebräuchlichen Tiermodell für die menschliche Fetalperiode, wurde der Einfluss von chronischem mütterlichen Stress in der frühen (30. bis 100. Gestationstag; 150 Tage Gestationsdauer; 0,2 bis 0,66 der Gestation) und späten Phase der Gravidität (100. bis 120. Gestationstag; 0,66 bis 0,79 der Gestation) auf die Reifung und Entwicklung der fetalen HHN – Achse untersucht. Darüber hinaus wurden die Effekte von maternalem Stress mit den Auswirkungen einer Gabe von synthetischen Glucocorticoiden, wie sie klinisch zur Induktion der fetalen Lungenreifung bei einer drohenden Frühgeburt in etwa 10 % aller Schwangerschaften Anwendung findet, verglichen.

28 trächtige Schafe wurden auf eine der vier Versuchsgruppen (Kontrollgruppe, früher maternaler Stress; später maternaler Stress, Gabe von synthetischen Glucocorticoiden) randomisiert. Als artgerechter Stressor der trächtigen Muttertiere wurde eine wiederholte Isolation (zweimal 3 Stunden pro Woche) von der Herde angewendet, welche entweder während der frühen ($n = 7$) oder während der späten Trächtigkeit ($n = 7$) durchgeführt wurde und in einer anhaltenden Erhöhung der maternalen Cortisolspiegel resultierte. Die Tiere der Gruppe mit synthetischen Glucocorticoiden ($n = 7$) erhielten zwei Behandlungszyklen mit jeweils $2 \times 110 \mu\text{g}$ Betamethason pro Kilogramm Körpergewicht intramuskulär im Abstand von 24 Stunden am 106./107. sowie 112./113. Gestationstag (0,71 und 0,75 der Gestation). Ein Behandlungszyklus entspricht einer in der klinischen Praxis verwendeten Gabe von $2 \times 8 \text{ mg}$ Betamethason für eine 70 kg schwere Schwangere zur Induktion einer fetalen Lungenreifung.

Zur Untersuchung der Funktionalität der fetalen HHN-Achse wurde mittels Natrium-Nitroprussid eine fetale Hypotension als physiologischer Stressor induziert, wie er unter der Geburt, bei einer Nabelschnurokklusion und Infekten auftritt. Die Aktivität der HHN-Achse wurde am 112. Gestationstag (0,7 der Gestation; 12 Tage nach Ende des frühen Stressses) sowie am 129. Gestationstag (0,86 der Gestation; 29 Tage nach Ende des frühen und 9 Tage nach Ende des späten Stressses) untersucht.

Da die physiologische Ausreifung der fetalen HHN-Achse zu einer funktionellen Einheit um den 120. Gestationstag stattfindet, konnte somit eine Untersuchung vor und während deren Reifung erfolgen.

Weder pränataler Stress noch die Applikation von synthetischen Glucocorticoiden bewirkten am 112. Gestationstag, das heißt vor der Reifung der HHN-Achse, eine veränderte fetale Cortisolausschüttung. Im Gegensatz hierzu führte am 129. Gestationstag, das heißt nach der Reifung der HHN-Achse, als Zeichen einer hyperreaktiven HHN-Achse sowohl später maternaler Stress als auch eine Behandlung mit synthetischen Glucocorticoiden zu einer erhöhten fetalen Kortisolantwort auf eine fetale Hypotension. Früher Stress resultierte in einer nochmals deutlich erhöhten Kortisolausschüttung gegenüber einer fetalen Hypotension.

Damit führt pränataler Stress während der gesamten Schwangerschaft wie auch die Gabe synthetischer Glucocorticoide im letzten Trimenon zur Programmierung einer hyperresponsiven HHN-Achse, wobei die Entwicklungsgeschwindigkeit nicht beeinflusst wird. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich eine Sollwertverstellung des negativen Rückkopplungsmechanismus der HHN-Achse. Die hierfür ursächliche Desensitivierung der Glucocorticoidrezeptoren beruht am ehesten auf einer epigenetischen Methylierung der Rezeptorgene.

Hieraus kann geschlossen werden, dass eine Hyperaktivität der HHN-Achse im späteren Leben über weite Zeiträume der Pränatalphase durch erhöhte Cortisolspiegel programmiert wird. Deshalb sollte auf eine enge Indikationsstellung zur Anwendung einer pränatalen Glucocorticoidtherapie geachtet und eine übermäßige Stressbelastung von Schwangeren vermieden werden.

2 Einleitung

2.1 Konzept der fetalen Programmierung von Erkrankung im späteren Leben

Das Konzept der Entstehung von Krankheiten unterlag in den letzten beiden Jahrzehnten einem grundlegenden Wandel. Während Mediziner vor den Überlegungen David Barkers zur fetalen Programmierung von Krankheiten davon ausgingen, dass Erkrankungen entweder durch angeborene oder im späteren Leben erworbene Defekte entstehen, ist es heute anerkannt, dass dieses Konzept unvollständig war. Neben genetischen Faktoren spielen auch negative oder veränderte intrauterine Umgebungsfaktoren, z. B. pränataler Stress in Form von Mangelernährung, maternalem Stress oder einer Behandlung mit synthetischen Glucocorticoiden für die Prädisposition von Krankheiten eine wichtige Rolle. Diese verändern bestimmte Gene bereits im Mutterleib und können so zu Krankheiten im späteren Leben führen. Unter dem Konzept der fetalen Programmierung kann insgesamt ein Prozess verstanden werden, bei welchem ein bestimmter Stimulus, der während eines kritischen Zeitfensters innerhalb der Pränatalphase einwirkt, zu einem dauerhaften Effekt, z. B. der Prädisposition von Erkrankungen, führt (Barker 1998).

2.2 Pränataler Stress und die Programmierung von neuropsychiatrischen Erkrankungen

Etwa ein Viertel aller Schwangeren leidet an anhaltendem, psychosozialem Stress (Loomans et al. 2012), weshalb pränataler Stress eine hohe klinische Relevanz aufweist. Für die pränatale Programmierung spielt insbesondere der Einfluss von Stresshormonen auf den Fetus eine wesentliche Rolle. Stresshormone, denen der Fetus entweder durch mütterlichen Stress oder durch die Gabe von synthetischen Glucocorticoiden während der Schwangerschaft ausgesetzt ist, führen zu einer Desensitivierung der HHN-Achse. Als Folgeerscheinung treten gehäuft neuropsychiatrische Erkrankungen im späteren Leben auf. Dieser Zusammenhang konnte in epidemiologischen und tierexperimentellen Studien insbesondere für Depressionen, Autismus und kognitive Verhaltensauffälligkeiten belegt werden (Beydoun und Saftlas 2008, Glover et al. 2010, van den Bergh et al. 2005).

2.2.1 Depressionen

Depressionen gehen mit einer hyperaktiven HHN-Achse einher. So konnte bei depressiven Patienten ein erhöhter Spiegel an adrenocorticotrophen Hormon (ACTH) und ein gesteigerter Cortisolbasalspiegel sowie eine geringere Cortisolsuppression im Dexamethason-Hemmtest festgestellt werden (Guerry und Hastings 2011). Bei depressiven Patienten konnte darüber hinaus eine Erhöhung der Zytokinkonzentration beobachtet werden (Leonard 2001a), welche wahrscheinlich über eine Desensitivierung gegenüber immunsuppressiven Effekten des Cortisols vermittelt wird (Pariante und Miller 2001). Zytokine bewirken wiederum neben einer Beeinflussung der Glucocorticoidrezeptor-Expression eine verminderte Serotonin- und Noradrenalin ausschüttung im Gehirn (Leonard 2001b). Eine antidepressive Therapie mit selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren kann wiederum durch eine Verringerung der extrahypothalamischen Konzentration an Cortico-Releasing-Hormon (CRH) zu einer Normalisierung der HHN-Achse führen (Nemeroff und Owens 2004).

Dass pränataler Stress mit Depressionen assoziiert ist, legt eine Reihe von epidemiologischen und tierexperimentellen Studien nahe. Bereits ein einzelnes, belastendes Erlebnis, z. B. ein Erdbeben während der Schwangerschaft genügt, um die Inzidenz an Depressionen bei der nachfolgenden Generation zu erhöhen (Watson et al. 1999). Aber auch chronischer maternaler Stress, z. B. das Erleben des holländischen Hungerwinters in den Jahren 1944 und 1945 führte bei der nachfolgenden Generation zu einem Anstieg der Inzidenz für Depressionen (Brown et al. 1995). Ebenso konnte für andere Arten des pränatalen Stresses, z. B. eine maternale Depression, ein Zusammenhang mit Symptomen einer Depression bereits im Kindesalter nachgewiesen werden (O'Connor et al. 2002). Neben einer durchweg erhöhten Cortisolkonzentration bei insgesamt abgeflachtem Cortisoltagesprofil zeigten weibliche Jugendliche, deren Mütter zwischen der 12. bis 22. Schwangerschaftswoche unter starken Sorgen und Ängstlichkeit litten, im Children's Depression symptoms Inventory (CDI) depressionstypische Symptome (van den Bergh et al. 2008).

Depressionstypische Verhaltensmuster (Abe et al. 2007) und pathologische zirkadiane Rhythmen mit Dysregulation der Cortisolsekretion (Dugovic et al. 1999) und des Schlafes (Maccari et al. 2003) finden sich auch im Tiermodell bei der nachfolgenden Generation pränatal gestresster Ratten.

2.2.2 Kognitive Verhaltensauffälligkeiten

Eine Bindung von Cortisol an Gluco- und Mineralocorticoidrezeptoren im Bereich des limbischen Systems bewirkt eine Modifizierung der Lernprozesse, der Gedächtnisleistung und des Verhaltens (Asztalos 2012). Somit lassen sich über eine Beeinflussung der HHN-Achse auch Auswirkungen auf die Kognition durch pränatalen Stress vermuten. Bereits zu Beginn der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde nachgewiesen, dass Stress in der Schwangerschaft, z. B. durch emotional belastete Partnerschaften, zu einer verspäteten Sprachentwicklung der Kleinkinder führt (Stott 1973). Subjektiv stark emotional belastende Episoden in der Frühschwangerschaft schlagen sich im weiteren Leben in Form schlechterer Schulleistungen nieder (Niederhofer und Reiter 2004). Die niederländische Psychologin Van den Bergh fand durch eine prospektive Studie heraus, dass eine ausgeprägte Ängstlichkeit der Mütter während der ersten Hälfte der Schwangerschaft (12. bis 22. Schwangerschaftswoche) mit Verhaltensänderungen der Nachkommen im Jugendalter verbunden ist. Dies äußerte sich insbesondere bei den männlichen Nachkommen, bei denen anhand kontinuierlicher Leistungstests Einschränkungen im Bereich der Aufmerksamkeit und der Reaktionszeit festgestellt werden konnten (van den Bergh et al. 2006).

Ebenso führt pränataler Stress im Tierexperiment, z. B. bei Ratten, welche pränatal mittels Flackerlicht gestresst wurden, zu kognitiven Einschränkungen in Form eines gestörten Gedächtnisses und des räumlichen Orientierungssinns (Kapoor et al. 2009). Als anatomisch physiologisches Korrelat kann in diesem Zusammenhang eine Verminderung der hippocampalen Synapsendichte (Hayashi et al. 1998) und eine Reduktion der neuronalen Langzeitpotenzierung (Son et al. 2006) festgestellt werden.

2.2.3 Autismus

In zwei epidemiologische Studien konnte gezeigt werden, dass Mütter autistischer Kinder etwa doppelt so häufig stressigen Lebensereignissen während der Schwangerschaft ausgesetzt waren, als Mütter gesunder Kinder (Beverdorf et al. 2005, Ward 1990). Kinney und Miller konnten neben der Feststellung einer allgemeinen Häufung von autistischen Nachkommen bei Müttern, die während der Schwangerschaft objektivierbarem Stress ausgesetzt waren, die Zeitfenster einer gesteigerter Vulnerabilität für das Stressereignis eingrenzen. So scheint pränataler Stress zwischen dem 5. bis 6. Schwangerschaftsmonat und innerhalb der letzten Wo-

chen der Schwangerschaft mit einem besonders hohen Risiko für die Entwicklung eines autistischen Krankheitsbildes im späteren Leben verbunden zu sein (Kinney et al. 2008).

Im Primatenmodell wurde eine verminderte Kontaktaufnahme zur Umwelt und stereotype Bewegungsabläufe, wie sie bei autistischen Kindern häufig vorzufindenden sind, nach pränatalem Stress beobachtet (Clarke 1996).

2.2.4 Schizophrenie

Eine hyperaktive HHN-Achse wird bei schizophrenen Patienten gefunden (Übersicht in: Walker et al. 2008). Als pathophysiologische Grundlage gilt eine synergistische Wirkung von Glucocorticoiden auf die Aktivität dopaminerger Neurone, welche vor allem in Hirnarealen des mesolimbischen Systems zu beobachten ist (Marinelli et al. 2006).

Ausgeprägte maternale Stresssituationen, z. B. die deutsche Invasion der Niederlande im Jahr 1940, scheinen das Risiko der Nachkommen, an Schizophrenie zu erkranken, zu erhöhen (van Os und Selten 1998). Der Tod oder eine schwere Erkrankung eines nahestehenden Menschen während der Schwangerschaft ist ebenfalls mit einer Zunahme des Erkrankungsrisikos für Schizophrenie in der Folgegeneration assoziiert (Huttunen und Niskanen 1978). Doch auch scheinbar geringere maternale Stressoren, z. B. eine ungewollte Schwangerschaft, begünstigen die Entwicklung einer Schizophrenie im Laufe des späteren Lebens (Herman et al. 2006, Myhrman et al. 1996). Auch wenn kein einheitliches Schizophreniemodell im tierexperimentellen Bereich existiert, konnten typische Merkmale der Schizophrenie, z. B. die Störung des Kurzzeitgedächtnisses und die Beeinträchtigung bestimmter Lernprozesse, an pränatal gestressten Ratten und Mäusen nachgewiesen werden (Kapoor et al. 2009, Son et al. 2006).

2.3 Auswirkungen von synthetischen Glucocorticoiden auf die fetale Entwicklung

Ähnlich wie pränataler Stress haben synthetische Glucocorticoide das Potenzial, Erkrankungen im späteren Leben zu begünstigen. Eine Behandlung mit synthetischen Glucocorticoiden erfolgt in ca. 10 % aller Schwangerschaften zur Induktion der fetalen Lungenreifung bei drohender Frühgeburt (Polyakov et al. 2007).

Wiederholte pränatale Glucocorticoidapplikationen führen – im Gegensatz zu einer einmaligen Gabe (Dalziel et al. 2005, Dessens et al. 2000) – zu Verhaltensauffälligkeiten bei 3- bis 6

jährigen Kindern im Sinne einer vermehrten Aggression und Hyperkinetik (French et al. 2004).

Darüber hinaus führt die Gabe von synthetischen Glucocorticoiden, welche zur Induktion der Lungenreife eingesetzt wird, zu einer Wachstumsretardierung, welche durch eine Verminderung des Geburts- (French et al. 1999) und Hirngewichts (Kutzler et al. 2004) gekennzeichnet ist. Ein vermindertes Geburtsgewicht ist wiederum mit der Entstehung von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen assoziiert (Barker et al. 1993, Law et al. 2002, McMillen und Robinson 2005).

Synthetische Glucocorticoide bewirken dabei eine anhaltende Desensitivierung des Feedback-Mechanismus der fetalen HHN-Achse. Hieraus resultieren im Vergleich zu Unbehandelten stärkere Stressantworten sowohl im Mutterleib (Schwab et al. 2012) als auch im späteren Leben (Alexander et al. 2012).

2.4 Mechanismen der Programmierung neuropsychiatrischer Erkrankungen

2.4.1 Übertragungswege von maternalen Stress auf den Fetus

Grundsätzlich stellt sich die Frage, wie Stress von der Mutter auf den Fetus übertragen wird, um so bereits während der Schwangerschaft den Grundstein für Erkrankungen im späteren Leben legen zu können.

Die Reaktion auf Stress wird dabei durch zwei verschiedene Systeme vermittelt: zum einen durch das schnell und kurzfristig agierende autonome Nervensystem, zum anderen durch die verzögerte, länger anhaltende Stressantwort der HHN-Achse (Goldstein und Kopin 2008).

Stressmediatoren des autonomen Nervensystems sind die von der Nebennierenrinde ausgeschütteten Katecholamine. Die Stressübermittlung im Bereich der HHN-Achse geschieht über das Steroidhormon Cortisol. Im Gegensatz zum Cortisol können Katecholamine die Plazenta nicht passieren (Giannakouloupoulos et al. 1999), was nahelegt, dass maternale Katecholamine keinen direkten Einfluss auf den Fetus haben. Durch ihre vasokonstriktiven Eigenschaften könnte jedoch die Blutzufuhr zur Plazenta verringert werden. Über eine daraus resultierende fetale Hypoxie ist grundsätzlich eine Stressübertragung möglich, wie am Schafmodell durch eine maternale Noradrenalininfusion gezeigt werden konnte (Stevens und Lumbers 1995).

Im Gegensatz zu den indirekt wirksamen Katecholaminen ist Cortisol aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften plazentagängig (Blanford und Murphy 1977) und hat somit unmittelbare Auswirkungen auf den Fetus (Barbazanges et al. 1996, Beydoun und Saftlas 2008, Glover et al. 2010, Nuyt 2008). Dabei existiert eine lineare Korrelation zwischen mütterlichem und fetalem Cortisol (Gitau et al. 1998), auch wenn das plazentare Enzym 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vom Typ-2 (11 β -HSD2) ca. 90 % des maternalen Cortisols in inaktives Cortison umwandelt. Der fetale Cortisolspiegel beträgt beim fetalen Schaf etwa ein Zehntel des maternalen Cortisolspiegels (Gitau et al. 2001). Es wird angenommen, dass dieses Cortisol größtenteils von der Mutter stammt (Hennessy et al. 1982), da beim Schafsfetus bis zur Mitte des dritten Trimenons wichtige Schlüsselenzyme der Steroidsynthese inaktiv sind (Tangalakakis et al. 1989). Im Gegensatz zum maternalen Cortisol können synthetische Glucocorticoide die Plazenta ungehindert passieren, da diese aufgrund ihres veränderten molekularen Aufbaus nicht von 11 β -HSD2 konvertiert werden (Benediktsson et al. 1997).

2.4.2 Physiologie und Reifung der fetalen HHN-Achse

Die HHN-Achse ist eine neuroendokrine Funktionseinheit welcher die Regulation der hormonellen Stressantwort durch die Ausschüttung von Cortisol obliegt und die mithilfe von Feedback – Mechanismen gesteuert wird (Übersicht in: Herman et al. 2003)

Über eine basale Aktivierung oder durch das Einwirken von Stressoren auf den Körper werden hypophysiotrophische Neurone im paraventriculären Kern des Hypothalamus zur Bildung des CRH und von Arginin-Vasopressin angeregt (Antoni 1986, Whitnall 1993). Die Substanzen werden über ein portales System zum Hypophysenvorderlappen weitergeleitet, in welchem eine ACTH-Freisetzung hervorgerufen wird. Arginin-Vasopressin wirkt synergistisch zum CRH und ermöglicht einen noch verstärkten ACTH-Ausstoß (Lowry et al. 1986). ACTH wiederum wird über die systemische Zirkulation zur Nebennierenrinde transportiert und induziert dort über einen Anstieg des intrazellulären zyklischen Adenosin-Monophosphat (cAMP) die Glucocorticoidsynthese und -sekretion (Hall 2001, Mountjoy et al. 1992). Wahrscheinlich spielen noch weitere Faktoren für die Freisetzung von Glucocorticoiden eine Rolle, die nicht zwangsläufig an erhöhte ACTH-Spiegel gebunden sind (Ulrich-Lai und Engeland 2002). Das freigesetzte Cortisol initiiert vielfältige Körperreaktionen, die von einer Anhebung des kardiovaskulären Tonus, katabolen Mechanismen im Stoffwechsel zur Bereitstellung von Energie, über die Dämpfung von immunologischen und inflammatorischen Prozessen (Munck

und Naray-Fejes-Toth 1992) bis hin zu Verhaltens- und Stimmungsänderungen reichen (Chrousos und Kino 2007). Physiologischerweise unterliegt der Glucocorticoidspiegel pulsatilen Schwankungen und weist des Weiteren eine zirkadiane Rhythmik mit Höchstwerten in den Morgenstunden auf (Nader et al. 2010).

Im Gehirn wirkt Cortisol über zwei verschiedene Subtypen von intrazellulären Corticoidrezeptoren (de Kloet et al. 1998). Der Mineralocorticoid-Rezeptor (auch Typ 1-Rezeptor genannt) befindet sich überwiegend in hippocampalen Hirnanteilen und ist durch eine hohe Bindungsaffinität für Glucocorticoide gekennzeichnet, die bereits bei physiologischen Spiegeln nahezu vollständig gesättigt sind. Der Glucocorticoid-Rezeptor (auch Typ 2-Rezeptor genannt) kann im gesamten Gehirn nachgewiesen werden (Reul und de Kloet 1985) und besitzt eine geringere Bindungsaffinität gegenüber Cortisol, weshalb eine Rezeptorsättigung erst bei sehr hohen Glucocorticoidwerten erzielt wird, wie sie z. B. im Rahmen einer medikamentösen Glucocorticoidbehandlung oder bei Stressreaktionen auftreten.

Einen regulatorischen Effekt weist die Bindung von Cortisol an zentralen Glucocorticoidrezeptoren im Bereich des Hypothalamus und der Hypophyse auf, über welche eine direkte Hemmung der CRH- und ACTH-Ausschüttung und somit auch der Cortisolsynthese vermittelt wird (Vazquez 1998). Zusätzlich erfolgt eine indirekte Inhibition des paraventriculären Kerns über Rezeptoraktivierungen im Bereich des Hippocampus und des präfrontalen Kortex. Dieser auch als negative Rückkopplung bezeichnete Vorgang führt zu einer Selbstlimitation der Stressantwort (Stratakis und Chrousos 1995) und hilft somit, schädliche Langzeiteffekte erhöhter Glucocorticoidspiegel zu verhindern.

Die einzelnen Bestandteile der HHN-Achse reifen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tegethoff et al. 2009). So wurde im menschlichen Fetus beispielsweise die Ausbildung des Hypothalamus ab der siebten (Brosnan 2001), die Produktion von corticotrophen Hormonen und ACTH ab der siebten bis achten (Asa et al. 1986, Baker und Jaffe 1975) und die Reifung des hypothalamo-hypophysären Portalsystems ab der Mitte der elften Schwangerschaftswoche nachgewiesen (Thliveris und Currie 1980). Es wird davon ausgegangen, dass erst nach der Verdopplung der Nebennierengröße zwischen der 20. und 30. Schwangerschaftswoche eine De novo Produktion von fetalem Cortisol ab der 30. Schwangerschaftswoche einsetzt (Mesiano und Jaffe 1997).

Ein Großteil des Wissens zu den Reifungsmechanismen der HHN-Achse stammt aus Tierversuchen am fetalen Schaf, das Tiermodell an welchem die pränatale Glucocorticoid- Therapie zur Induktion der fetalen Lungenreifung etabliert wurde (Liggins und Howie 1972).

Am fetalen Schaf konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Reifung der Nebennieren nicht kontinuierlich abläuft. Nach einer initialen Wachstumsphase der Nebennieren vom 40. bis 60. Gestationstag (Gestationsdauer 150 Tage), ab welcher experimentell bis zum 90. Gestationstag eine ACTH getriggerte Bildung von Cortisol auslösbar ist, folgt vom 90. bis 120. Gestationstag eine wahrscheinlich durch eine Inaktivierung wichtiger Schlüsselenzyme bedingte funktionelle Ruhephase mit einer relativen Unempfindlichkeit gegenüber ACTH (Wintour et al. 1995). Diese Diskontinuität spiegelt sich auch in den Cortisolspiegeln des fetalen Schafes zu unterschiedlichen Gestationszeitpunkten wider, wie Messungen von Braun bestätigten (Braun et al. 2009). So konnte entsprechend der Messzeitpunkte nach einem Höchstwert um den 50. Gestationstag ein Abfall der fetalen Cortisolwerte am 100. Gestationstag beobachtet werden, bevor es am 140. Gestationstag zu einem erneuten Anstieg kam.

Die Entwicklung von fetalen Glucocorticoidrezeptoren im Bereich des Hypothalamus und der Hypophyse, welche für die Regulation der HHN-Achse essenziell sind, ist zwischen dem 60. und 70. Gestationstag (0,4 bis 0,47 der Gestation) nachweisbar, was anhand von histologischen Untersuchungen in fetalen Schafen gezeigt werden konnte (Yang et al. 1990). Glucocorticoidrezeptor-mRNA-Analysen konnten eine stetige Expressionssteigerung für Glucocorticoidrezeptoren bis zum 109. Gestationstag (0,73 der Gestation) (Sloboda et al. 2008) nachweisen. Beim menschlichen Feten entwickeln sich im Bereich des Hippocampus ab der 24. Gestationswoche (0,63 der Gestation) sowohl Mineralo- als auch Glucocorticoidrezeptoren (Noorlander et al. 2006).

Zu einer Reifung der HHN-Achse als Funktionseinheit und einer damit verbundenen Aufnahme der fetalen Cortisolproduktion kommt es jedoch erst gegen Ende der Schwangerschaft. So können beim fetalen Schaf ab dem 125. Gestationstag stetig steigende Cortisolspiegel nachgewiesen werden (Challis et al. 2001).

2.5 Programmierung der Aktivität der fetalen HHN – Achse

Wie bereits erwähnt, wird die Aktivität der HHN-Achse im Wesentlichen über die Besetzung der Glucocorticoidrezeptoren mit Cortisol im Bereich des Hypothalamus und der Hypophyse

gesteuert, welche für den negativen Feedback-Mechanismus verantwortlich sind. Die Aktivität des Regelkreises wird bereits während der fetalen Reifung der HHN-Achse durch den fetalen Serumcortisolspiegel programmiert (Schwab et al. 2012, Seckl und Meaney 2004).

Ein erhöhter fetaler Cortisolspiegel während vulnerabler Phasen bewirkt eine Desensitivierung der Glucocorticoidrezeptoren im Hypothalamus und Hippocampus, was zu einer Verminderung des negativen Feedbacks und somit zu einer Cortisolerhöhung führt.

Ursächlich für die Desensitivierung der Glucocorticoidrezeptoren sind epigenetische Mechanismen mit einer Erhöhung der DNA-Methylierung. Die verstärkte DNA-Methylierung betrifft höchstwahrscheinlich das Promotoren des Glucocorticoidrezeptors NR3C. Dadurch wird die Expression von Glucocorticoidrezeptoren und damit die negative Feedbackregulation vermindert (Turner et al. 2010). Als Folge des desensitisierten negativen Feedbackmechanismus der HHN-Achse konnte tierexperimentell eine anhaltende Erhöhung des Cortisolausstoßes gezeigt werden (Schwab et al. 2012).

Erhöhte fetale Cortisolspiegel können durch synthetische Glucocorticoide oder durch gesteigerte maternale Cortisolwerte hervorgerufen werden (Kajantie et al. 2004, Sarkar et al. 2008).

Bisherige Erkenntnisse der Wirkung von Stresshormonen auf die reifende HHN-Achse wurden hauptsächlich durch Experimente mit einer pränatalen Applikation von synthetischen Glucocorticoiden gewonnen.

So konnte Braun am fetalen Schaf feststellen, dass eine maternale Betamethasonapplikation in der frühen Trächtigkeit (40./41. Gestationstag, Trächtigkeitsdauer 150 Tage, 0,27 der Gestation) zu einer initialen Suppression des fetalen Cortisolspiegels am 50. Gestationstag und einem wesentlich höheren Cortisolbasalspiegel am Ende der Trächtigkeit führt (Braun et al. 2009). Nach einer kontinuierlichen, intravenösen Betamethasongabe über 48 Stunden im dritten Trimenon (0,83 Gestation) konnte am fetalen Schaf eine Sollwertverstellung der HHN-Achse mit einem verminderten Nachweis von Glucocorticoidrezeptor- mRNA in der Hypophyse und den Nebennieren beobachtet werden. Daraus resultierte vier Tage nach der Applikation ein erhöhter Basalcortisolwert sowie eine intensivere Ausschüttung von Cortisol nach hypoxieinduziertem Stress (Fletcher et al. 2004). Eine verminderte fetale, zentralnervöse Glucocorticoidrezeptordichte nach einer Behandlung mit synthetischen Glucocorticoiden konnte in weiteren tierexperimentellen Studien bestätigt werden (Matthews 2002, Sloboda et al. 2008).

Dass die Beeinflussung der Funktionalität der HHN-Achse durch synthetische Glucocorticoide kein passageres Ereignis darstellt wurde durch Sloboda et al. belegt, welche nach einer einmaligen maternalen Betamethasonapplikation am 104. Gestationstag (0,67 der Gestation) sowohl einen erhöhten Basalcortisolspiegel, als auch eine gesteigerte Cortisolausschüttung im Stimulationsversuch mit CRH bei einjährigen Nachkommen beobachteten (Sloboda et al. 2002).

Anhand weiterer Untersuchungen an dreijährigen Lämmern konnte jedoch herausgefunden werden, dass vier maternale Betamethasoninjektionen im wöchentlichen Abstand ab dem 104. Gestationstag sowohl eine Suppression der basalen als auch der stimulierten Cortisolspiegel zur Folge haben (Sloboda et al. 2007).

3 Ziele der Arbeit

Wie bereits zuvor beschrieben ist pränataler Stress mit einem vermehrten Auftreten von neuro-psychiatrischen Erkrankungen, assoziiert (Übersicht: (Beydoun und Saftlas 2008)). Als ein bedeutender Mechanismus wird eine Desensitivierung der HHN-Achse angenommen, welche durch erhöhte maternale Cortisolspiegel in Form von pränatalem Stress oder synthetischen Glucocorticoiden vermittelt wird.

Es ist zu vermuten, dass mehrere vulnerable Zeitfenster während der Entwicklung der HHN-Achse existieren. So konnte anhand prospektiver Studien gezeigt werden, dass maternaler Stress in der frühen Schwangerschaft (12. bis 22. Schwangerschaftswoche) bei den Nachkommen zu einer hyperaktiven HHN-Achse führt, während maternaler Stress zu späteren Zeitpunkten keine messbaren Auswirkungen zeigte (van den Bergh et al. 2006, van den Bergh et al. 2008). Zugleich konnte anhand tierexperimenteller Studien mit synthetischen Glucocorticoiden dargelegt werden, dass sowohl Applikationen zu frühen, als auch zu späteren Gestationszeitpunkten zu einer veränderten Funktionalität mit anfänglicher Suppression und folgender Hyperaktivität der fetalen HHN-Achse führen (Braun et al. 2009, Schwab et al. 2012, Sloboda et al. 2008).

Die genaue Lage und Länge dieser vulnerablen Zeitfenster ist somit noch unklar und bedarf weiterer Erforschung, da die Kenntnis solcher Zeitfenster eine große Bedeutung für die Entwicklung primärpräventiver Maßnahmen darstellt.

Über die intrauterine Entwicklung der HHN-Achse des Menschen und deren Anfälligkeit gegenüber pränatalem Stress liegen wenige Daten vor. Der Grund hierfür ist die Notwendigkeit invasiver Versuchsmethoden, welche aus ethischer Sicht nicht vertretbar sind und daher tierexperimentelle Untersuchungen erforderlich machen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, anhand des tierexperimentellen Modells des fetalen Schafes:

- 1) die Auswirkungen von pränatalem Stress auf die Reifung und Funktionalität der fetalen HHN-Achse zu untersuchen. Um vulnerable Zeitfenster eingrenzen zu können

wurde eine frühe Stressphase, welche sich über das erste und zweite Trimester erstreckte, sowie eine späte Stressphase während des dritten Trimesters gewählt.

- 2) die Effekte einer Applikation von synthetischen Glucocorticoiden im letzten Trimenon, wie sie zur Induktion der Lungenreifung angewandt wird, mit den Effekten von pränatalem Stress auf die Entwicklung der fetalen HHN-Achse zum klinisch relevanten Zeitpunkt zu vergleichen.

Zur Untersuchung der oben genannten Hypothesen wurde das Modell des fetalen Schafes verwendet, welches besonders gut geeignet ist, da hieran die Behandlung mit synthetischen Glucocorticoiden zur Beschleunigung der fetalen Lungenreifung etabliert wurde (Liggins und Howie 1972). Zudem erlaubt das fetale Schaf die chronische Instrumentierung mit EKG-Elektroden, sowie arteriellen und venösen Kathetern, welche für die Versuchsabfolge notwendig sind.

Zur Induktion von maternalem Stress wurde eine wiederholte Isolation der trächtigen Muttertiere von der Herde vorgenommen. Die Isolation, welche auch bei wiederholter Anwendung zu einem Anstieg der maternalen Cortisolkonzentration führt, gilt als geeigneter Stressor für Schafe (Roussel et al. 2004). Zur Bestimmung vulnerabler Zeitfenster erfolgte die Aufteilung in zwei Isolationsstressphasen. Ein Teil der trächtigen Schafe wurde während der frühen Gestation, ein anderer während der späten Gestation durch Isolation gestresst. Eine dritte Untersuchungsgruppe erhielt zum klinisch relevanten Zeitpunkt (0,7 bis 0,75 der Gestation) eine gewichtsadaptierte Gabe von Betamethason, um die Effekte von pränatalem Stress zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit den Effekten einer Applikation von synthetischen Glucocorticoiden vergleichen zu können.

Die Auswirkungen von pränatalem Stress bzw. synthetischen Glucocorticoiden auf die Funktion der fetalen HHN-Achse wurde mithilfe einer durch Natrium-Nitroprussid herbeigeführten Hypotension getestet, welche zu einer reproduzierbaren Aktivierung der HHN-Achse mit konsekutiver Cortisolausschüttung beim Schaf führt (Wood 1986). Eine Hypotension gilt als typischer fetaler Stressor, welcher auch im Rahmen von Infektionen oder während des Geburtsvorganges auftritt (Low 2004). Um herauszufinden, ob pränataler Stress oder die Gabe synthetischer Glucocorticoiden neben einer veränderten Funktionalität auch eine verfrühte Reifung der fetalen HHN-Achse induzieren, erfolgte eine Testung der fetalen HHN-Achsenaktivität sowohl vor als auch während der physiologischen Reifung der fetalen HHN-Achse.

4 Originalpublikation

Stress, 2012; Early Online: 1–8
 © 2012 Informa Healthcare USA, Inc.
 ISSN 1025-3890 print/ISSN 1607-8888 online
 DOI: 10.3109/10253890.2012.686541

informa
healthcare

Effects of early- and late-gestational maternal stress and synthetic glucocorticoid on development of the fetal hypothalamus–pituitary–adrenal axis in sheep

FLORIAN RAKERS^{1,*}, VILMAR FRAUENDORF^{1,3,*}, SVEN RUPPRECHT¹,
 RENE SCHIFFNER¹, SABINE J. BISCHOFF², MICHAEL KIEHNTOFF⁴,
 PETRA REINHOLD⁵, OTTO W. WITTE¹, HARALD SCHUBERT²,
 & MATTHIAS SCHWAB¹

¹Hans Berger Department of Neurology, Jena University Hospital, Jena, Germany, ²Institute of Laboratory Animal Sciences and Welfare, Jena University Hospital, Jena, Germany, ³Department of Hepatology and Gastroenterology, Charité Berlin, Berlin, Germany, ⁴Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Jena University Hospital, Jena, Germany, and ⁵Institute of Molecular Pathogenesis, The Friedrich-Loeffler-Institut, Jena, Germany

(Received 22 November 2011; revised 27 February 2012; accepted 16 April 2012)

Abstract

Prenatal maternal stress (PMS) programs dysregulation of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis (HPAA) in postnatal life, though time periods vulnerable to PMS, are still unclear. We evaluated in pregnant sheep the effect of PMS during early gestation [30–100 days of gestation (dGA); term is 150 dGA] or late gestation (100–120 dGA) on development of fetal HPAA function. We compared the effects of endogenous cortisol with synthetic glucocorticoid (GC) exposure, as used clinically to enhance fetal lung maturation. Pregnant sheep were exposed to repeated isolation stress twice per week for 3 h in a separate box with no visual, tactile, or auditory contact with their flock-mates either during early ($n = 7$) or late ($n = 7$) gestation. Additional groups received two courses of betamethasone (BM; $n = 7$; $2 \times 110 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight, 24 h apart) during late gestation (106/107 and 112/113 dGA, $n = 7$) or acted as controls ($n = 7$). Fetal cortisol responses to hypotensive challenge, a physiological fetal stressor, were measured at 112 and 129 dGA, i.e. before and during maturation of the HPAA. Hypotension was induced by fetal infusion of sodium nitroprusside, a potent vasodilator. At 112 dGA, neither PMS nor BM altered fetal cortisol responses. PMS, during early or late gestation, and BM treatment increased fetal cortisol responses at 129 dGA with the greatest increase achieved in stressed early pregnant sheep. Thus, development of the HPAA is vulnerable to inappropriate levels of GCs during long periods of fetal life, whereas early gestation is most vulnerable to PMS.

Keywords: Fetus, glucocorticoids, hypotension; hypothalamus–pituitary–adrenal axis, prenatal stress, prematurity, fetal programming

Introduction

Exposure to inappropriate levels of glucocorticoids (GCs) at critical stages of fetal development seems to have a lifelong impact on the function of hypothalamus–pituitary–adrenal axis (HPAA) which is regarded as one of the major mechanisms of fetal programming of health and disease in later life (Cottrell and Seckl 2009). In particular, the programming effects of prenatal exposure to maternal stress and excess synthetic GCs on HPAA function are regarded

as significant contributors to the etiology of neuropsychiatric and cardiovascular diseases (Van den Bergh et al. 2005; Alexander 2006; Beydoun and Saftlas 2008; Nuyt 2008; Glover et al. 2010). Prenatal stress as well as prenatal administration of synthetic GCs program hyperactivity of the HPAA has been shown in human and animal studies (Sloboda et al. 2002; Coe et al. 2003; Glover et al. 2005; Van den Bergh et al. 2008; Tegethoff et al. 2009). Notably, synthetic GCs are prescribed in late gestation in about 10% of

Correspondence: F. Rakers, Jena University Hospital, Hans Berger Department of Neurology, 07747 Jena, Germany. Tel: +49 3641 9323401. Fax: +49 3641 9323402. E-mail: Florian.Rakers@med.uni-jena.de

*These authors contributed equally to this work.

pregnancies to enhance fetal lung maturation in women threatened with premature labor (Polyakov et al. 2007).

Programming effects of prenatal GCs appear to vary with respect to time of exposure, although knowledge concerning exact periods of vulnerability is limited. Despite the finding that the HPAA matures at the end of gestation (Challis et al. 2001) and development of glucocorticoid receptors (GRs) begins in mid-gestation (Matthews et al. 1995), Van den Bergh et al. (2008) have shown that in humans, maternal anxiety during early pregnancy is more strongly associated with increased HPAA activity in the 15-year-old offspring than is stress during mid- and late gestation. However, validation in an experimental model is essential as effects of maternal stress during pregnancy are confounded by maternal care after birth. As in prenatal stress, programming effects of synthetic GCs depend on the time of administration during gestation as well as dose. Experimental studies in fetal sheep, the model in which prenatal GC therapy was developed (Liggins and Howie 1972), have shown that the fetal HPAA is vulnerable to dexamethasone in early pregnancy leading to increased basal cortisol concentrations near term. Sloboda et al. (2002) reported that a single injection of betamethasone (BM) to pregnant sheep at mid-gestation induced elevated basal values and stimulated cortisol concentrations even at 1 year of age. However, three additional BM injections, each 1 week apart, did not have the same effect on basal cortisol concentrations.

Determining the developmental window for greatest stress sensitivity is essential to provide maximum preventive care and targeted therapy in terms of functional programming of the HPAA. Yet, the effects of maternal stress on the fetus with respect to the time of stress exposure are largely unknown. We hypothesized that (i) maternal stress during early pregnancy (i.e. during the first and second-trimester of gestation) and late pregnancy (i.e. during the last trimester) has different programming effects on fetal HPAA function in sheep. Furthermore, we hypothesized that (ii) administration of synthetic GCs in late pregnancy, when administration is clinically relevant, may have similar effects on fetal HPAA function as maternal stress during late pregnancy. Hence, pregnant sheep, a major animal model for fetal physiology, were repeatedly isolated from the flock during early or late gestation. Isolation, constituting a typical major ovine stressor, was used because it is known to increase maternal cortisol concentrations reliably in sheep (Roussel et al. 2005). Another group of sheep were exposed to synthetic GCs at the pregnancy stage and dose used clinically to enhance fetal lung maturation. The effects of maternal stress or GC treatment on fetal HPAA function were tested by a hypotensive challenge as a common fetal stressor (Low 2004), which causes quantifiable and reproducible cortisol responses (Wood 1986). Hypotensive

challenges were performed before and during maturation of the fetal HPAA in late gestation to examine whether maternal stress affects fetal HPAA development or rather resets HPAA function.

Materials and methods

All procedures were approved by the Animal Welfare Commission for animal research of the Free State of Thuringia and are in accordance with the European Communities Council Directives. For the purpose of this study, 39 Long-Wool Merino \times Blackheaded Mutton were cross-bred on a single occasion. Following breeding, the 39 pregnant ewes were divided randomly into control, early and late stress, and a BM group. The four groups were held in different paddocks at the same facility. Ewes were fed 100% of the nutritional requirement throughout pregnancy, and water was provided *ad libitum*. During pregnancy environmental temperature was natural as outside ambient temperature. Studies were done during springtime.

Maternal stress protocol

Eighteen pregnant sheep followed a repeated maternal stress protocol between 30 and 100 ± 2 (mean \pm SEM) days of gestation (dGA; early stress; term = 150 dGA) and seven pregnant sheep between 100 and 120 ± 2 dGA (late stress). Maternal stress was induced by isolating pregnant ewes in a well-lit box ($3.0 \text{ m} \times 3.0 \text{ m} \times 1.4 \text{ m}$, $w \times l \times h$) with no visual, tactile, or auditory contact with flock-mates. During isolation, ewes had no access to food or water supply. Ewes were isolated for 2 days per week (Monday to Friday) with at least 2 days recovery time between the particular isolation bouts. Duration of isolation was 3 h. Isolation was performed either between 07:00 and 10:00 h, 11:00 and 14:00 h, or 15:00 and 18:00 h. Day of the week and time of isolation as well as the isolation box were changed randomly within the mentioned parameters to reduce habituation.

Maternal blood samples were collected by puncturing the jugular vein at 30, 44, 59, 72, and 89 dGA (early stress), and 110 dGA (late stress) before and during isolation to estimate maternal cortisol concentrations and the degree of habituation. Pregnant control and BM-treated ewes, were held under the same conditions as stressed ewes but did not undergo isolation procedures and blood sampling.

Surgical instrumentation

Following the repeated stress procedure, seven of the early stressed ewes and all seven of the late stress ewes were transported to the surgery facilities at least 3 days before undergoing surgery for chronic fetal instrumentation at 104 ± 1 dGA (controls, early stress, and

BM) or 124 ± 1 dGA (late stress). Ewes were kept in rooms with controlled light/dark cycles (14 h light and 10 h dark with lights on from 07:00 to 21:00 h) and air conditioning (18°C and 50% relative air humidity). Hay and water were provided *ad libitum*. Before the surgical procedure, which is described in detail elsewhere (Schwab et al. 2001), ewes received no food for a period of 24 h. Thereafter, the ewes were sedated with 1 g ketamine intramuscularly (Ketamin 10, Atarost, Twistringen, Germany), and general anesthesia was induced by inhalation of 4% isoflurane (Isoflurane®, AstraZeneca, Wedel, Germany) via a face mask. Ewes were intubated, and anesthesia was maintained with 1.5% isoflurane in 100% oxygen. Ewes were instrumented with catheters (Rüschelitz, Rüsch, Kernen, Germany) inserted into the carotid artery and the jugular vein to draw blood samples and for postoperative administration of antibiotics, respectively. Laparotomy and hysterotomy were performed for chronic fetal instrumentation. To provide the same intrauterine conditions for all fetuses during instrumentation, we removed the smaller fetus in twin pregnancies. The smaller fetus was identified by comparing the vertex-to-nose length through the unopened uterus. Directly after removal, the smaller fetus was euthanized using 360 mg of intracardiac sodium pentobarbital (Narcoren, Merial, Hallbergmoos, Germany) while still under general anesthesia with isoflurane. Fetuses were instrumented with catheters inserted into the left common carotid artery for fetal arterial blood pressure (FBP) recording and blood sampling and into the left external jugular vein for sodium nitroprusside (SNP) injection. To correct FBP for hydrostatic pressure, a third catheter was placed in the amniotic cavity to record the amniotic pressure. For electrocardiogram recording, stainless steel wire electrodes (LIFY, Metrofunk Kabel-Union, Berlin, Germany) were implanted in the left suprascapular muscles, right shoulder muscles, and in the sternum cartilage. All catheters and electrode wires were exteriorized from the uterus and the abdomen through the maternal flank, and both uterus and abdomen were then closed with sutures. Catheters were maintained patent using a continuous infusion of heparinized saline (12.5 UI/ml ; 0.5 ml/h). After surgery, ewes were returned to their home cage and received intravenous 0.5 g ampicillin (Ampicillin-ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Germany) twice a day for the next 3 days. Fetuses received the same dose of ampicillin via the amniotic sac. Analgesia was ensured by i.v. administration of metamizol (Arthri-pur®, Atarost, Twistringen, Germany) twice a day ($30\text{--}50 \text{ mg kg}^{-1}$) for as long as necessary.

BM treatment

Seven pregnant sheep that had not been stressed received two courses of BM at 106 and 107 dGA

and at 112 and 113 dGA. Each course of BM consisted of two doses of $110 \mu\text{g kg}^{-1}$ BM phosphate administered 24 h apart (Celestan, Essex, Munich, Germany). This dose is equivalent to the dose used clinically to enhance fetal lung maturation ($8 \text{ mg BM weight adjusted for a } 70 \text{ kg woman}$).

Fetal stress response (hypotensive challenge)

Fetal cortisol was examined in response to a hypotensive challenge at 112 ± 1 dGA (controls, early stress, and BM group before the second course of BM treatment) and at 129 ± 2 dGA (all groups). The hypotensive challenge was induced in the morning hours by infusion of SNP (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deisenhofen, Germany; SNP acts as a donor of nitric oxide which is a potent vasodilator); $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ SNP was infused into the fetal jugular vein after filling the dead space of the catheter. SNP infusion rate started at 0.1 ml min^{-1} and was increased stepwise for every 2 min. After 12 min, i.e. at a rate of 3.2 ml min^{-1} , SNP infusion was stopped. Fetal and maternal arterial blood samples were taken prior to the stress responses to analyze blood gases and oxygen saturation using a blood gas analyzer (ABL600, Radiometer, Copenhagen, Denmark; measurements corrected to 39°C). Plasma cortisol concentrations were determined 30 min before, at the end (0 min), 15, 45, and 75 min following the completion of SNP infusion; 1 ml of arterial blood samples was collected in chilled ethylenediaminetetraacetic acid tubes, and the plasma was separated by centrifugation at 4°C for 10 min with 3000g, flash frozen, and stored at -80°C .

Hormone analyses

Fetal plasma cortisol was measured using a commercially available radioimmunoassay (RIA; DPC Coat-A-Count Radioimmunoassay, Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. RIA sensitivity was 5.4 nmol l^{-1} . For plasma pools measuring 27.6 and 138 nmol l^{-1} , intraassay coefficients of variation were 6.91% and 6.94%, respectively.

Statistical analysis

Normal distribution of all data was tested by the Shapiro-Wilk test. Following this, within-group analysis was done by Friedman's ANOVA and/or Wilcoxon paired test applied to maternal cortisol responses, maternal area under the curve (AUC) values as well as cortisol concentrations during the hypotensive challenge. Differences in hormone values between the treatment and control groups within the respective hypotensive challenges and differences between fetal AUC values were tested

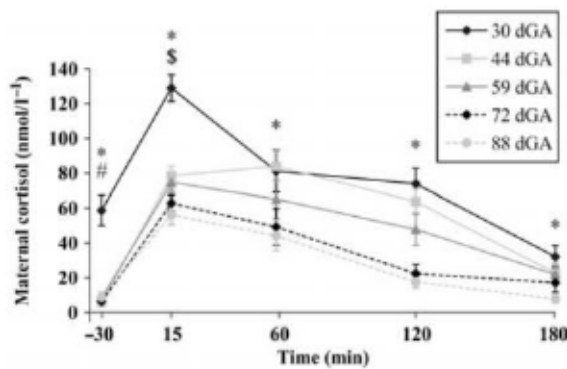


Figure 1. Maternal cortisol response profiles in venous blood samples from pregnant sheep exposed to repeated isolation stress for 3 h twice a week in early gestation [30–100 days gestation (dGA), $n = 18$]. Data are mean \pm SEM; * $P < 0.001$, 30 dGA vs. 88 dGA; # $P < 0.001$, 30 dGA vs. the following dGA; \$ represents all groups, $P < 0.001$, -30 min vs. 15 min; Friedman's ANOVA and/or Wilcoxon paired test.

for significance by Kruskal–Wallis ANOVA followed by *post-hoc* analysis with Mann–Whitney *U*-test. *P*-values were adjusted using the Bonferroni–Shaffer method. Significance was assumed at a *P* value < 0.05 . All values are given as mean \pm SEM. The integrated cortisol response was estimated using the AUC in accordance with the formula:

$$\text{CORT} = \sum_{i=1}^{n-1} 1/2(\text{Cort}_i + \text{Cort}_{i+1})\Delta t.$$

Results

Maternal stress response to isolation

Maternal cortisol concentrations differed at baseline (Friedman's ANOVA: $\chi^2 = 19.87$, $df = 4$, $P < 0.001$, Figure 1). Maternal cortisol concentrations were elevated prior to the first bout of isolation at 30 dGA compared to the following isolation bouts (Wilcoxon: all $P < 0.001$, Figure 1). Maternal baseline cortisol concentrations did not differ between 44 and 110 dGA (Figures 1 and 2). Repeated isolation resulted for each isolation bout in an immediate (Wilcoxon: all $P < 0.001$, -30 vs. +15 min, Figure 1) and sustained (Wilcoxon: all $P < 0.001$, isolation vs. baseline, Figure 2) maternal cortisol response. For stress in early gestation, the first isolation bout was associated with the greatest maternal cortisol increase (Wilcoxon: all $P < 0.001$, AUC of first vs. following isolation bouts, Figure 2) which, however, decreased over time (Wilcoxon: all $P < 0.001$, 30 dGA vs. 88 dGA, Figure 1). In the late stress group, maternal cortisol concentrations at 110 dGA were similar to concentrations at 72 and 88 dGA in the early stress group (Figure 2).

Fetal stress response to hypotensive challenge

There were no differences in levels of arterial blood gases and pH values between the groups at 112 and 129 dGA. Moreover, both parameters were within the physiological range (Table I). FBP increased and fetal heart rate (FHR) decreased in the control, early stress, and BM groups with regard to the development of the cardiovascular system between 112 and 129 dGA (Wilcoxon: all $P < 0.05$, Table I). However, basal FHR and basal FBP did not differ among the groups (Table I).

Fetal basal cortisol concentrations were similar between 112 and 129 dGA in the control, early stress, and BM groups and did not differ among the four groups at 112 and 129 dGA (Figure 3). Exposure to SNP produced an immediate decrease in FBP compared to baseline in all groups at 112 and 129 dGA, which was associated with an immediate increase in FHR (Wilcoxon: all $P < 0.05$, Table II). Minimum FBP was slightly lower in early stressed fetuses at 112 dGA and in early and late stressed fetuses at 129 dGA (Mann–Whitney: all $P < 0.05$, Table II), but not in BM-treated fetuses compared to controls. FHR increase after SNP exposure was greater in early stressed fetuses at 112 dGA and in early and late stressed fetuses at 129 dGA compared to controls (Mann–Whitney: all $P < 0.05$, Table II).

At 112 dGA, administration of SNP did not lead to increased cortisol concentrations (Figure 3). In contrast to the values at 112 dGA, SNP led to an increase of plasma cortisol concentrations in all groups at 129 dGA compared to baseline (Wilcoxon: all $P < 0.05$, baseline vs. 15 min, Figure 3). Moreover, at the end of SNP administration, the cortisol increase was greater in the early and late stress, and BM groups compared to that of controls (Mann–Whitney: all $P < 0.05$, Figure 3). Indeed, 15 min after the SNP infusion, fetal cortisol concentrations differed among the four groups [Kruskal–Wallis: $H(3) = 15.91$, $P = 0.012$], and the early stress group showed the

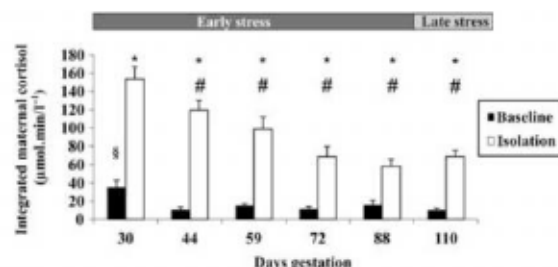


Figure 2. Integrated maternal cortisol response in pregnant sheep exposed to repeated isolation stress for 3 h twice a week at selected isolation bouts in early [30–100 days gestation (dGA), $n = 18$] and late (100–120 dGA, $n = 7$) gestation. Data are mean \pm SEM; * $P < 0.001$ compared to baseline; # $P < 0.001$ compared to 30 dGA; \$ $P < 0.001$ compared to later gestational ages; Wilcoxon paired test.

Table I. Fetal physiological parameters before hypotensive challenge.

	Controls	BM	Early stress	Late stress
112 dGA				
FBP (mmHg)	38.6 ± 1.0	37.7 ± 0.8	38.9 ± 0.9	
FHR (min ⁻¹)	181.8 ± 2.9	186.0 ± 2.7	179.2 ± 4.3	
pH	7.35 ± 0.01	7.35 ± 0.01	7.33 ± 0.02	
pCO ₂ (mmHg)	41.9 ± 3.1	43.7 ± 2.8	41.1 ± 3.7	
pO ₂ (mmHg)	27.2 ± 1.1	25.5 ± 1.8	24.6 ± 2.0	
O ₂ sat. (%)	74.2 ± 4.4	75.4 ± 4.6	77.7 ± 5.0	
129 dGA				
FBP (mmHg)	43.3 ± 0.8*	42.9 ± 1.8*	43.8 ± 1.6*	40.7 ± 1.1
FHR (min ⁻¹)	161.5 ± 5.1*	162.8 ± 2.7*	162.8 ± 4.0*	175.7 ± 6.4
pH	7.35 ± 0.01	7.37 ± 0.02	7.37 ± 0.02	7.35 ± 0.02
pCO ₂ (mmHg)	40.7 ± 3.1	44.7 ± 1.3	39.6 ± 3.3	43.2 ± 2.0
pO ₂ (mmHg)	28.3 ± 1.8	26.0 ± 2.1	25.4 ± 2.0	27.3 ± 0.2
O ₂ sat. (%)	76.6 ± 2.3	79.8 ± 2.7	80.0 ± 4.6	81.7 ± 7.1

Notes: Fetal physiological parameters in controls ($n = 7$), early (30–100 dGA, $n = 7$), and late (100–120 dGA, $n = 7$) isolation-stressed and BM-treated ewes ($n = 7$) before a hypotensive challenge induced by fetal infusion of SNP; FBP, fetal arterial blood pressure; FHR, fetal heart rate. Data are mean ± SEM. * $P < 0.05$ compared to 112 dGA by Wilcoxon paired test.

greatest cortisol response (Mann–Whitney: all $P < 0.05$, Figure 3). This exaggerated cortisol response in the early stressed group was prolonged for up to 75 min after the end of the infusion procedure (Mann–Whitney: $P < 0.05$, early stress vs. controls, Figure 3). In agreement with this, the integrated fetal cortisol response differed among the four groups [Kruskal–Wallis: $H(3) = 16.04$, $P = 0.001$, Figure 4] and was greater in the early and late stress, and BM groups than in controls with the highest integrated cortisol response found in the early stress group (Mann–Whitney: all $P < 0.05$, Figure 4).

Discussion

The aim of this study was to examine the development of fetal HPA function after the exposure of sheep to repeated isolation stress during early and late pregnancy. We have shown that repeated stress during pregnancy leads to an increased fetal cortisol response at the end of gestation, which is dependent on the timing of the stress experience. Early repeated stress during the first and second trimester (30–100 dGA) had a more pronounced effect on the increase in fetal cortisol concentrations than late stress or BM administration during the third trimester (100–120 dGA). Our data showed that exposure to maternal stress and synthetic GCs alters the set point of HPA function and increases HPA activity at the end of gestation in an analogous manner.

We used isolation as a typical stress paradigm for inducing early and late stress in pregnant ewes. The significant and manifest increase in maternal circulating cortisol concentrations during each stress time period was at least sevenfold compared to non-stressed ewes. However, with advancing pregnancy, we found a slight decrease in maternal cortisol

responses. This decreased response is in accordance with other studies (Coppinger et al. 1991; Roussel et al. 2004) and signifies either habituation to isolation stress or a pregnancy-related decrease of sensitivity to stress. A comparison between the cortisol responses of the late stress group at 110 dGA (10 days after the start of stress) and of the early stress group at 88 dGA, the last time point of cortisol assessment (58 days after

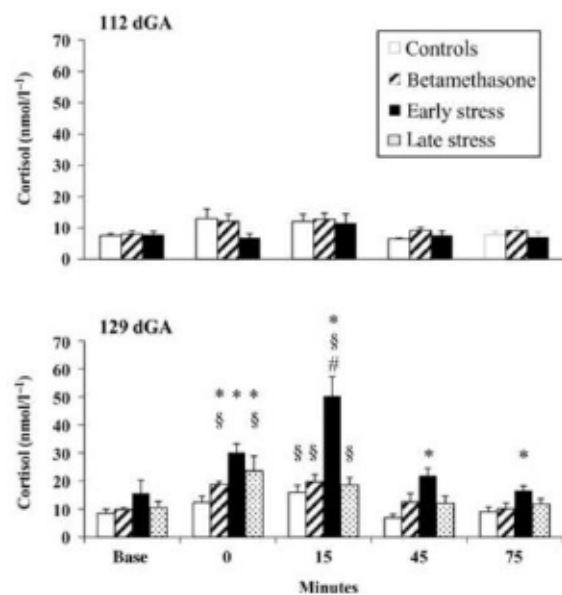


Figure 3. Fetal carotid arterial blood cortisol responses to hypotensive challenge induced by fetal jugular vein infusion of SNP at 112 and 129 days gestation (dGA) in controls ($n = 7$), early (30–100 dGA, $n = 7$), and late (100–120 dGA, $n = 7$) isolation stressed ewes, and following maternal BM administration at 106/107 and 112/113 dGA ($n = 7$). Data are mean ± SEM; * $P < 0.05$ compared to controls; § $P < 0.05$ compared to baseline; # $P < 0.05$ compared to control, late stress, or BM groups, 15 min after the end of SNP infusion; Kruskal–Wallis ANOVA, Mann–Whitney U -test, and/or Wilcoxon paired test.

Table II. Fetal physiological parameters during hypotensive challenge.

	Controls	BM	Early stress	Late stress
112 dGA				
Base FBP (mmHg)	38.6 ± 1.0	37.7 ± 0.8	38.9 ± 0.9	
Min FBP (mmHg)	25.3 ± 1.0*	20.8 ± 1.8*	19.6 ± 1.8* [§]	
Base FHR (min ⁻¹)	181.8 ± 2.9	186.0 ± 2.7	179.2 ± 4.3	
Peak FHR (min ⁻¹)	204.8 ± 4.2*	217.4 ± 11.6*	251.1 ± 5.2* [§]	
129 dGA				
Base FBP (mmHg)	43.3 ± 0.8	42.9 ± 1.8	43.9 ± 1.6	40.7 ± 1.1
Min FBP (mmHg)	27.2 ± 1.0*	23.9 ± 1.3*	20.6 ± 1.6* [§]	22.4 ± 1.1* [§]
Base FHR (min ⁻¹)	161.5 ± 5.1	162.8 ± 2.7	162.8 ± 4.0	175.7 ± 6.4
Peak FHR (min ⁻¹)	193.9 ± 8.9*	199.1 ± 9.0*	221.8 ± 7.2* [§]	227.4 ± 4.2* [§]

Notes: Baseline fetal arterial blood pressure (Base FBP) and baseline fetal heart rate (Base FHR) before, and minimum FBP (Min FBP) and peak fetal heart rate (Peak FHR) at the end of a hypotensive challenge induced by fetal infusion of SNP in controls ($n = 7$), or in ewes exposed to isolation stress early [30–100 days gestation (dGA), $n = 7$] and late (100–120 dGA, $n = 7$), and in ewes after a first course of prenatal BM treatment applied at 106/107 dGA ($n = 7$). Data are mean ± SEM. * $P < 0.05$ compared to baseline by Wilcoxon paired test, [§] $P < 0.05$ compared to controls by Mann–Whitney U -test.

the start of stress), showed essentially no difference. This indicates that the reduced maternal cortisol response is more likely to be pregnancy-related rather than an effect of habituation. Indeed, pregnant ewes show a decrease in acute anxiety over time (Vierin and Bouissou 2001). Similarly, the maternal response of the HPA axis to stressful challenges also decreases with advancing pregnancy in humans (de Weerth and Buitelaar 2005).

The baseline cortisol measurement of the first isolation bout was elevated compared to the following baselines, reflecting the novelty stress of blood sampling. The rapid adaptation to the blood sampling procedure compared to the low adaptation to the isolation stress is also reflected in the finding that the third blood sampling during the first isolation bout did not provide additional stress for the ewes (Figure 1). In the light of the total amount of isolation stress perceived, the contribution of stress induced by blood sampling was likely to be negligible.

We applied SNP to induce a hypotensive challenge in order to measure HPA responses in fetuses. Fetal exposure to hypotension is a clinically relevant challenge to human fetuses that can occur during birth, through intrauterine infection, and in high-risk pregnancies (Low 2004). Induction of hypotension in fetal sheep using SNP to test HPA activity has also been used successfully in other studies (Wood 1986; Frasch et al. 2007).

FBP increased and FHR decreased slightly over the experimental period, indicating physiological maturation of the cardiovascular system, and this is in line with patterns of change reported by others (Unno et al. 1999). SNP led to a significant FBP decrease in all four study groups, which was slightly more pronounced in early and late stressed fetuses than in controls and BM-treated fetuses. Consecutively, early and late stressed fetuses showed a slightly larger reflex increase in FHR. The somewhat more pronounced decrease of FBP in response to SNP in the stressed

ewes could have led to a stronger HPA response (Wood 1986), with a consecutively greater cortisol increase. But, as early and late stressed fetuses did not show a similar increase in cortisol concentrations, the slightly more pronounced FBP decrease did not substantially contribute to the higher cortisol increase.

Our data are in agreement with clinical studies showing that development of HPA function is vulnerable to maternal stress during fetal life, and where early stress seems to generate more pronounced effects than late stress (Van den Bergh et al. 2008). This is of particular interest, as fetal HPA function develops during late gestation (Challis et al. 2001), and GRs including binding sites and GR mRNA are not detectable before 70 dGA (Rose et al. 1985; Yang et al. 1990; Matthews et al. 1995). The early stress period in our study lay between early and mid-gestation (30–100 dGA). Hence, either the effects of

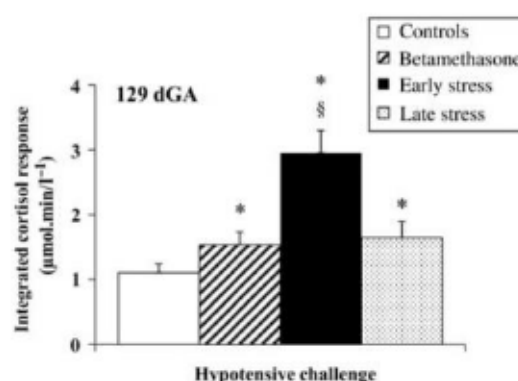


Figure 4. Integrated fetal carotid arterial blood cortisol responses to hypotensive challenge at 129 days gestation (dGA) induced by fetal jugular vein infusion of SNP in controls ($n = 7$), early (30–100 dGA, $n = 7$), and late (100–120 dGA, $n = 7$) isolation stressed ewes, and following BM administration at 106/107 and 112/113 dGA ($n = 7$). Data are mean ± SEM; * $P < 0.05$ compared to controls; [§] $P < 0.05$ compared to late stress or BM; Kruskal–Wallis ANOVA and Mann–Whitney U -test.

prenatal stress on the development of the HPAA are mediated via unknown mechanisms or only the late phase of our early stress period sufficiently affected HPAA development. The former assumption is supported by the study of Braun et al. (2009) who showed that dexamethasone treatment at 40 dGA leads to increased HPAA activity at the end of gestation. In that study, the effects of dexamethasone treatment within 36 h contradict the notion that HPAA hyperactivation is a consequence of the prolonged impact of stress (70 days in early vs. 20 days in late stressed fetuses). This view is supported by the finding that 3 weeks of repeated isolation stress during late gestation causes similar effects as two doses of BM twice, each 1 week apart.

The effects of early stress on the development of the HPAA were not detectable at 112 dGA but at 129 dGA, which is probably due to the commencement of physiological maturation of the HPAA occurring after 112 dGA (Challis et al. 2001). Early stress did not lead to an earlier beginning of HPAA maturation indicating that early stress alters the set point of the HPAA rather than affecting its maturation. In a previous study, we have shown that resetting the set point occurs at the central level of the HPAA (Schwab et al., in press). Mechanisms responsible for this resetting are thought to be associated with changes in the expression of GR, involving negative feedback regulation of the HPAA at the level of the limbic system, hypothalamus, or pituitary (Matthews 2002), which likely result from epigenetic changes in gene methylation (Glover et al. 2010). However, the exact mechanism as to how GCs contribute to GR gene methylation is still unclear.

Our data show that prenatal stress and BM treatment during late pregnancy have similar effects on HPAA activity. This is remarkable as about 90% of maternal cortisol, but not BM, is inactivated to cortisone by placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD2). Thus, wide fluctuations in maternal cortisol concentrations are translated into minor fluctuations in fetal cortisol load (Benediktsson et al. 1997). As the fetal adrenals are inactive until maturation of the HPAA at the end of gestation (Challis et al. 2001), the remaining 10% of maternal cortisol crossing the placenta results in sufficient fetal cortisol concentrations to instigate HPAA hyperactivation at the end of gestation. Admittedly, a recent study showed that repeated stress during pregnancy reduces placental 11 β -HSD2 in rats (Mairesse et al. 2007). Yet, the differing pharmacologic and metabolic characteristics of BM and cortisol make it difficult to directly compare their effects on the HPAA. In contrast to cortisol, BM crosses the placenta without appreciable inactivation (Blanford and Murphy 1977; Kajantie et al. 2004); its potency is 30 times higher than cortisol (Axelrod 1976); and it

binds exclusively to GR, whereas cortisol binds to GR and mineralocorticoid receptors (Schwab et al. 2000).

Maternal stress effects on the fetus may not only be transferred by GCs that cross the placenta (Van den Bergh et al. 2005), but also by an impaired uterine artery blood flow, possibly by catecholamine-mediated vasoconstriction (Teixeira et al. 1999). This potentially reduces fetal oxygen supply and may affect indirectly HPAA development. In summary, the current study bridges research relating to the impact of prenatal maternal stress (PMS) and synthetic GC treatment on the development of the HPAA, in that it combines both a stressor and exogenous GC exposure in one experimental setting. In line with other clinical studies, our data show that development of HPAA function, which matures during late gestation, is sensitive to inappropriate levels of GCs during preceding periods of fetal life. Earlier periods of gestation are particularly vulnerable. Exposure to endogenous or synthetic GCs during late gestation has similar effects, although transfer of endogenous GCs through the placental barrier is extremely limited. Finally, GCs reset the set point of the HPAA rather than having an effect on its maturation.

Acknowledgment

This work was supported by the Max Kade Foundation and HL068649.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Alexander BT. 2006. Fetal programming of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1–R10.
- Axelrod L. 1976. Glucocorticoid therapy. *Medicine (Baltimore)* 55: 39–65.
- Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. 1997. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: A key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46:161–166.
- Beydoun H, Saftlas AF. 2008. Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: A review of recent evidence. *Paediatr Perinat Epidemiol* 22:438–466.
- Blanford AT, Murphy BE. 1977. *In vitro* metabolism of prednisolone, dexamethasone, betamethasone, and cortisol by the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 127:264–267.
- Braun T, Li S, Sloboda DM, Li W, Audette MC, Moss TJ, Matthews SG, Polglase G, Nitsos I, Newnham JP, Challis JR. 2009. Effects of maternal dexamethasone treatment in early pregnancy on pituitary–adrenal axis in fetal sheep. *Endocrinology* 150:5466–5477.
- Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, Newnham J. 2001. The fetal placental hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol Cell Endocrinol* 185: 135–144.
- Coe CL, Kramer M, Czeh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C, Fuchs E. 2003. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the

- dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys. *Biol Psychol* 54: 1025–1034.
- Coppinger TR, Minton JE, Reddy PG, Blecha F. 1991. Repeated restraint and isolation stress in lambs increases pituitary–adrenal secretions and reduces cell-mediated-immunity. *J Anim Sci* 69: 2808–2814.
- Cottrell EC, Seckl JR. 2009. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci* 3:19.
- de Weerth C, Buitelaar JK. 2005. Physiological stress reactivity in human pregnancy – a review. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 295–312.
- Frasch MG, Muller T, Wicher C, Weiss C, Lohle M, Schwab K, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2007. Fetal body weight and the development of the control of the cardiovascular system in fetal sheep. *J Physiol* 579:893–907.
- Glover V, Miles R, Matta S, Modi N, Stevenson J. 2005. Glucocorticoid exposure in preterm babies predicts saliva cortisol response to immunization at 4 months. *Pediatr Res* 58: 1233–1237.
- Glover V, O'Connor TG, O'Donnell K. 2010. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 17–22.
- Kajantie E, Raivio T, Janne OA, Hovi P, Dunkel L, Andersson S. 2004. Circulating glucocorticoid bioactivity in the preterm newborn after antenatal betamethasone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3999–4003.
- Liggins GC, Howie RN. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50:515–525.
- Low JA. 2004. Determining the contribution of asphyxia to brain damage in the neonate. *J Obstet Gynaecol Res* 30:276–286.
- Mairesse J, Lesage J, Breton C, Breant B, Hahn T, Darnaudery M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S, Viltart O. 2007. Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1526–E1533.
- Matthews SG. 2002. Early programming of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab* 13:373–380.
- Matthews SG, Yang K, Challis JR. 1995. Changes in glucocorticoid receptor mRNA in the developing ovine pituitary and the effects of exogenous cortisol. *J Endocrinol* 144:483–490.
- Nuyt AM. 2008. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: Evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci (Lond)* 114:1–17.
- Polyakov A, Cohen S, Baum M, Trickey D, Jolley D, Wallace EM. 2007. Patterns of antenatal corticosteroid prescribing 1998–2004. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 47:42–45.
- Rose JC, Kute TE, Winkler L. 1985. Glucocorticoid receptors in sheep brain tissues during development. *Am J Physiol* 249: E345–E349.
- Roussel S, Hemsworth PH, Boissy A, Duvaux-Ponter C. 2004. Effects of repeated stress during pregnancy in ewes on the behavioural and physiological responses to stressful events and birth weight of their offspring. *Appl Anim Behav Sci* 85: 259–276.
- Roussel S, Boissy A, Montigny D, Hemsworth PH, Duvaux-Ponter C. 2005. Gender-specific effects of prenatal stress on emotional reactivity and stress physiology of goat kids. *Horm Behav* 47: 256–266.
- Schwab M, Roedel M, Anwar MA, Muller T, Schubert H, Buchwalder LF, Walter B, Nathanielsz W. 2000. Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *J Physiol* 528:619–632.
- Schwab M, Schmidt K, Roedel M, Mueller T, Schubert H, Anwar MA, Nathanielsz PW. 2001. Non-linear changes of electrocortical activity after antenatal betamethasone treatment in fetal sheep. *J Physiol* 531:535–543.
- Schwab M, Coksaygan T, Rakers F, Nathanielsz PW. in press. Glucocorticoid exposure of sheep at 0.7 to 0.75 gestation augments late gestation fetal stress responses. *Am J Obstet Gynecol*, doi:10.1016/j.ajog.2011.11.006.
- Sloboda DM, Moss TJ, Gurrin LC, Newnham JP, Challis JR. 2002. The effect of prenatal betamethasone administration on postnatal ovine hypothalamic–pituitary–adrenal function. *J Endocrinol* 172:71–81.
- Tegethoff M, Pryce C, Meinschmidt G. 2009. Effects of intrauterine exposure to synthetic glucocorticoids on fetal, newborn, and infant hypothalamic–pituitary–adrenal axis function in humans: A systematic review. *Endocr Rev* 30:753–789.
- Teixeira JM, Fisk NM, Glover V. 1999. Association between maternal anxiety in pregnancy and increased uterine artery resistance index: Cohort based study. *BMJ* 318:153–157.
- Unno N, Wong CH, Jenkins SL, Wentworth RA, Ding XY, Li C, Robertson SS, Smotherman WP, Nathanielsz PW. 1999. Blood pressure and heart rate in the ovine fetus: Ontogenic changes and effects of fetal adrenalectomy. *Am J Physiol* 276:H248–H256.
- Van den Bergh BR, Mulder EJ, Mennes M, Glover V. 2005. Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: Links and possible mechanisms. A review. *Neurosci Biobehav Rev* 29:237–258.
- Van den Bergh BR, Van Calster B, Smits T, Van Huffel S, Lagae L. 2008. Antenatal maternal anxiety is related to HPA-axis dysregulation and self-reported depressive symptoms in adolescence: A prospective study on the fetal origins of depressed mood. *Neuropsychopharmacol* 33:536–545.
- Vierin M, Bouissou MF. 2001. Pregnancy is associated with low fear reactions in ewes. *Physiol Behav* 72:579–587.
- Wood CE. 1986. ACTH, cortisol, and renin responses to arterial hypotension in sheep. *Am J Physiol* 251:R18–R22.
- Yang K, Jones SA, Challis JR. 1990. Changes in glucocorticoid receptor number in the hypothalamus and pituitary of the sheep fetus with gestational age and after adrenocorticotropin treatment. *Endocrinology* 126:11–17.

5 Diskussion

5.1 Methodische Betrachtungen

5.1.1 Das fetale Schaf als geeignetes experimentelles Tiermodell

Seit mehreren Jahrzehnten findet das chronisch instrumentierte fetale Schaf zur Erforschung der Fetalperiode erfolgreich Anwendung. Liggins et al. untersuchte mit dessen Hilfe bereits vor über 40 Jahren die Effekte einer pränatalen Glucocorticoidgabe auf die fetale Lungenreifeung (Liggins und Howie 1972) und schuf somit die Grundlage der bis heute angewandten antenatalen Glucocorticoidtherapie, welche bei drohender Frühgeburt zur Induktion der fetalen Lungenreifeung eingesetzt wird. Seitdem wurde eine Vielzahl experimenteller Studien am fetalen Schaf von physiologischen und pathophysiologischen Einflüssen auf die Entwicklung des Ungeborenen durchgeführt, welche insbesondere die Akut- und Langzeiteffekte von synthetischen Steroiden auf die fetale Entwicklung umfasste (Übersicht in: Newnham und Moss 2001).

Obwohl das fetale Schaf ein aufwendiges und kostenintensives tierexperimentelles Modell darstellt, weist es wesentliche Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen auf. Im Vergleich zu Mäusen und Ratten, bei denen die Hirn- und Lungenreifeung zu großen Anteilen postnatal abläuft (Hagberg und Mallard 2000), ähnelt die neuronale Entwicklung und die Alveolisierung der Lunge des fetalen Schafes der des menschlichen Fetus (Dobbing und Sands 1979, Jobe 2003). Eine ausreichende Größe und die meist vorkommenden Einlings- oder Zwillingsträchtigkeiten ermöglichen darüber hinaus eine sichere und adäquate chirurgische Instrumentierung.

5.1.2 Isolation als Stressparadigma

Zur Stressung der trächtigen Muttertiere wurde eine wiederholte Isolation von der Herde vorgenommen, welche als artgerechter Stressor für Schafe gilt (Niezgoda et al. 1987). Auf diese Weise konnte eine dauerhafte und signifikante Erhöhung der maternalen Cortisolspiegel während jeder Stressperiode erzielt werden, welche mindestens siebenmal höher im Vergleich zu Cortisolspiegeln ungestresser trächtiger Schafe lagen. Im Verlauf der Trächtigkeit konnte ein leichter Abfall der maternalen Cortisolantworten festgestellt werden. Dieser Rückgang wurde auch in einer anderen Studie beobachtet (Roussel S. et al. 2004). Als Erklärung hierfür kom-

men verschiedene Ursachen infrage: Einerseits kann es zu einer gewissen Habituation gegenüber der Isolationssituation als Stressor gekommen sein.

Andererseits kann auch eine zunehmende Stressunempfindlichkeit im Trächtigkeitsverlauf infrage kommen. Für Letzteres spricht ein Vergleich zwischen den maternalen Cortisolspiegeln der späten Stressgruppe am 110. Gestationstag (10 Tage nach Beginn des Isolationsstresses) und der frühen Stressgruppe am 88. Gestationstag (58 Tage nach Beginn des Isolationsstresses), welcher nahezu keinen Unterschied aufzeigt. Tatsächlich konnte anhand einer Studie von Vierin und Bouissou gezeigt werden, dass trächtige Schafe im Verlauf der Gestation eine verminderte akute Ängstlichkeit aufweisen (Vierin und Bouissou 2001). Ebenso wurde beim Menschen im Verlauf der Schwangerschaft eine verminderte physiologische Stressreaktivität festgestellt (de Weerth und Buitelaar 2005).

5.1.3 Testung der HHN-Achse mithilfe einer medikamentös induzierten Hypotonie

Zur Testung der Funktionalität und Autoregulation der HHN-Achse wurde eine medikamentös induzierte Hypotonie ausgewählt. Die fetale Hypotonie ist ein physiologischer Stressor, der auch beim Menschen im Rahmen von Infekten unter der Geburt oder bei Hochrisikoschwangerschaften auftritt (Low 2004).

Hierzu erfolgte eine sukzessive, intravenöse Applikation von Natrium-Nitroprussid (NNP) in den Kreislauf des Schaffetus. Als vasoaktive Substanz führt NNP über eine Blutdrucksenkung zu einer konsekutiven und reproduzierbaren Cortisolausschüttung, was zur Testung der HHN-Achse bereits in anderen Studien erfolgreich Anwendung fand (Frasch et al. 2007, Wood 1986).

Zwischen dem 112. und 129. Gestationstag konnte ein Anstieg des fetalen Blutdrucks und ein Abfall der fetalen Herzfrequenz festgestellt werden. Als Ursache hierfür kann eine entwicklungsbedingte Erhöhung des Herzzeitvolumens und des peripheren Widerstands in Frage kommen (Hanson 1995), welche als Reifungszeichen des kardiovaskulären Systems zu verstehen sind und auch in anderen Studien beobachtet wurden (Unno et al. 1999). Da Cortisol selbst stimulierende Effekte auf das kardiovaskuläre System hat (Tangalakakis et al. 1992), trägt wahrscheinlich auch der physiologischerweise im letzten Trimenon einsetzende Anstieg des fetalen Cortisolspiegels (Challis und Brooks 1989) hierzu bei.

Die Gabe von NNP führte in allen vier Studiengruppen zu einem relevanten Abfall des fetalen Blutdrucks, wobei dieser innerhalb der beiden Stressgruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlicher ausfiel. Dementsprechend kam es bei beiden Stressgruppen auch zu einem stärkeren, barorezeptorreflex-bedingten Anstieg der fetalen Herzfrequenz. Es wäre denkbar, dass die ausgeprägtere fetale Hypotension nach NNP-Gabe bei den gestressten Schaffeten zu einer gesteigerten Aktivierung der HHN-Achse mit vermehrter Cortisolausschüttung geführt hat (Wood 1986). Dem widerspricht jedoch, dass die Schaffeten der frühen und späten Stressgruppe einen unterschiedlichen Anstieg des Cortisolspiegel aufweisen. Der etwas ausgeprägtere Blutdruckabfall spielt daher wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle für den verstärkten Cortisolanstieg der frühen Stressgruppe.

5.2 Auswirkungen von pränatalem Stress auf die HHN-Achse

Sowohl früher, als auch später pränataler Stress führt zu einer funktionellen Hyperaktivität der fetalen HHN-Achse am 129. Gestationstag (0,86 der Gestation). Der fehlende Effekt von frühen maternalen Stress auf die Entwicklung der fetalen HHN-Achse am 112. Gestationstag (0,75 der Gestation) lässt vermuten, dass pränataler Stress keine vorzeitige Reifung der HHN-Achse induziert. Pränataler Stress scheint vielmehr über eine Sollwertverstellung eine funktionelle Hyperaktivität der HHN-Achse zu bewirken. Anhand einer vorangegangenen Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Sollwertverstellung auf zentraler Ebene der HHN-Achse geschieht (Schwab et al. 2012). Die Verstellung des negativen Feedbackmechanismus der HHN-Achse entsteht wahrscheinlich durch eine Verminderung von Bindungsstellen an Mineralo- und Glucocorticoidrezeptoren im Bereich des fetalen Hippocampus (Brunton 2010) sowie des limbischen Systems, des Hypothalamus und der Hypophyse (Matthews 2002). Als zugrunde liegender Mechanismus wird vermutet, dass pränataler Stress über epigenetische Mechanismen eine Veränderung der DNA-Methylierung in Promoterregionen wichtiger Schlüsselenzyme der Glucocorticoidrezeptoren bewirkt (Glover et al. 2010).

Trotz der Tatsache, dass 90 % des maternalen Cortisols im Gegensatz zu Betamethason durch das plazentare Enzym 11 β -HSD2 inaktiviert und damit ausgeprägte Schwankungen der maternalen Cortisolspiegel abgepuffert und verringert werden (Benediktsson et al. 1997), konnte wir nachweisen, dass pränataler Stress im dritten Trimenon vergleichbare Effekte auf die Funktionsfähigkeit der HHN – Achse hat wie eine maternale Betamethasonbehandlung in der späten Schwangerschaft. Die verbleibenden 10 % des maternalen Cortisols, welche die

Plazenta passieren, beeinflussen maßgeblich die Höhe des fetalen Cortisolspiegels und genügen offensichtlich für die Ausbildung einer hyperaktiven, fetalen HHN-Achse. Allerdings haben sowohl tierexperimentelle Studien an Nagern als auch Untersuchungen an schwangeren Frauen gezeigt, dass maternaler Stress zu einer Herabregulierung der 11 β -HSD2-mRNA und zu einer verminderten Enzymaktivität führt und damit den Cortisolübertritt auf den Fetus potenziert (Jensen Pena et al. 2012, O'Donnell et al. 2012). So bedingt ein Mangel an funktionfähigem 11 β -HSD2-Enzym während der Trächtigkeit molekulare und neurobiologische Veränderungen der HHN-Achse, was zu arterieller Hypertension, gesteigerter Ängstlichkeit und Stressreaktivität bei den Nachkommen beiträgt, wie im Mausmodell gezeigt werden konnte (Holmes et al. 2006, Welberg et al. 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen klinischen und tierexperimentellen Beobachtungen, welche gezeigt haben, dass die Entwicklung und Funktionsweise der fetalen HHN-Achse besonders durch maternalen Stress während der frühen Schwangerschaft beeinflusst werden (Mueller und Bale 2008, van den Bergh et al. 2008). Da die fetale HHN-Achse erst im letzten Trimenon zur einer Funktionseinheit ausreift (Challis et al. 2001) und mRNA-Analysen einen Nachweis von Glucocorticoidrezeptoren, im Bereich der Hypophyse, des Hypothalamus und des Hippocampus erst um den 70. Gestationstag (0,5 der Gestation) erbracht haben (Matthews et al. 1995, Rose et al. 1985, Yang et al. 1990), stellt sich die Frage, weshalb und auf welche Weise insbesondere Stress während der frühen Schwangerschaft so starke Auswirkungen nach sich zieht. Ein möglicher Erklärungsansatz kann z. B. eine Stressvermittlung über eine kompromittierte plazentare Durchblutung darstellen.

Eigene bisher unveröffentlichte Ergebnisse zeigen, dass akuter Isolationsstress im Schafmodell am 130. Gestationstag zu einem sofortigen Abfall der plazentaren Durchblutung führt (siehe Abbildung 1), welcher mit einer moderaten fetalen Laktazidose sowie einem Abfall der fetalen Sauerstoffsättigung einhergeht. Der beobachtete Abfall der plazentaren Durchblutung während einer akuten Stresssituation ist katecholaminvermittelt, da die maternale Applikation von Labetalol – einem potenten α - und β -Adrenorezeptorblocker – vor der akuten Stresssituation den plazentaren Fluss während des akuten Stresses aufrechterhält, was weitere unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe belegen. Diese Ergebnisse lassen auf eine bedeutende Rolle der Katecholamine bei der Stressübertragung schließen, welche zwar die Plazentaschranke nicht überwinden können, jedoch über eine Verminderung der plazentaren Durch-

blutung auf indirektem Weg zur Stressübertragung beitragen. Dies könnte erklären, weshalb Stress während der frühen Schwangerschaft mit einer ausgeprägteren Dysregulation der fetalen HHN-Achse verbunden ist, als Stress während der späten Schwangerschaft.

Die beobachtete verminderte Sauerstoffsättigung kann theoretisch zu einer verstärkten Bildung von freien Sauerstoffradikalen führen (Adams 1975). Freie Sauerstoffradikale wiederum führen zu einer veränderten DNA-Methylierung (Cerdea und Weitzman 1997) und haben somit das Potenzial, Reifungsprozesse dauerhaft zu beeinflussen. Somit sind neue primärpräventive Verfahren, z. B. die Applikation von Vitamin C und anderen Antioxidanzien denkbar. Am trächtigen Schaf konnte durch die Gabe von Vitamin C tatsächlich der placentare Blutfluss gesteigert und eine fetale Hypoxie vermieden werden (Thakor et al. 2010).

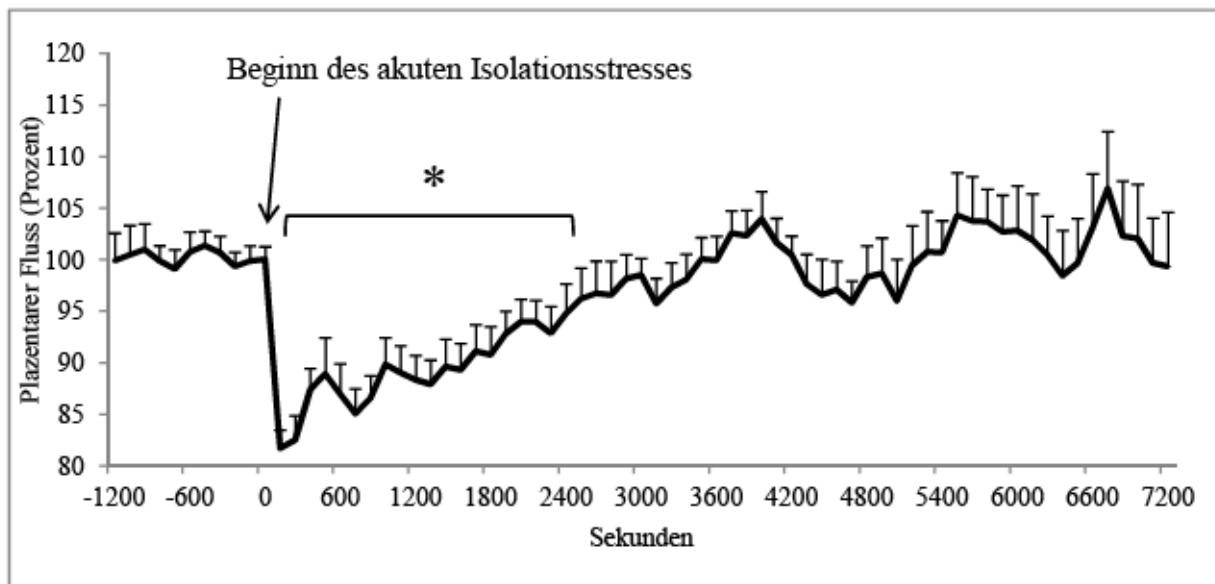


Abbildung 1: Relativer Plazentarer Blutfluss trächtiger Schafe am 130. Gestationstag vor und während eines akuten Isolationsstressversuches. MW + SEM; * $p < 0.01$ im Vergleich zum mittleren placentaren Blutfluss vor der Stressung; $n = 5$

5.3 Auswirkungen von synthetischen Glucocorticoiden auf die HHN-Achse

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine zweifache Betamethasongabe am 106./107. sowie 112./113. Gestationstag ähnlich wie pränataler Stress eine funktionelle Hyperaktivität der fetalen HHN-Achse bewirkt. Die Effektstärke war mit der einer 20-tägigen Stressphase in der späten Gestation vergleichbar. Ähnlich wie pränataler Stress scheint Betamethason zu diesem Zeitpunkt nicht zu einer vorzeitigen Reifung der HHN-Achse zu führen, was durch die fehlenden Effekte auf die fetalen HHN-Achse am 112. Gestationstag ersichtlich ist.

Ein unmittelbarer Vergleich von synthetischen Glucocorticoiden und maternalem Cortisol auf die Entwicklung der fetalen HHN-Achse ist aufgrund der unterschiedlichen pharmakologischen und metabolischen Eigenschaften nur schwer möglich. Abgesehen von einem ungehinderten plazentaren Transfer (Anderson et al. 1977), werden synthetische Glucocorticoide im Gegensatz zu Cortisol nicht an das Transportprotein Transcortin gebunden (Kajantie et al. 2004), was möglicherweise zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit im Fetus führt. Darüber hinaus hat Betamethason gegenüber natürlichem Cortisol eine 30-fach höhere Wirkstärke (Axelrod 1976) und bindet ausschließlich an Glucocorticoidrezeptoren, wogegen Cortisol sowohl an Gluco- als auch an Mineralocorticoidrezeptoren bindet (Schwab et al. 2000).

5.4 Vulnerable Zeitfenster während der Reifung der HHN-Achse

Anhand dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass pränataler Stress insbesondere während der frühen Gestation zu besonders ausgeprägten Effekten auf die Programmierung der HHN-Achse führt.

Da sich die frühe Stressperiode der Studie vom 30. bis zum 100. Gestationstag erstreckte, besteht die Möglichkeit, dass erst die letzten Tage der frühen Stressperiode zu einer Beeinflussung der HHN-Achsenentwicklung beitrugen.

Dass Glucocorticoide schon vor der Reifung der fetalen Glucocorticoidrezeptoren einen Einfluss auf die Entwicklung der fetalen HHN-Achse nehmen, konnte in einer Studie von Braun et al. gezeigt werden, bei welcher festgestellt wurde, dass eine maternale Dexamethasonbehandlung am 40. Gestationstag über 36 Stunden zu einer gesteigerten Aktivität der fetalen HHN-Achse am Ende der Trächtigkeit führt (Braun et al. 2009).

Bereits eine 36-stündige Einwirkung von synthetischen Glucocorticoiden während der frühen Trächtigkeit (Braun et al. 2009) führt zu vergleichbaren Effekten auf die Programmierung der Aktivität der fetalen HHN-Achse wie mehrwöchiger pränataler, maternaler Stress während der frühen und späten Trächtigkeit. Es scheint daher nicht die Dauer, sondern vor allem der Zeitpunkt der Glucocorticoideinwirkung während der Gestation eine wichtige Rolle für die Entwicklung einer hyperaktiven HHN-Achse zu spielen.

6 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal die Auswirkungen von objektivierbarem, pränatalem Stress sowie einer Therapie mit synthetischen Glucocorticoiden auf die Entwicklung der fetalen HHN-Achse gemeinsam in einem tierexperimentellen Versuchsaufbau untersucht und verglichen werden. Die Untersuchungen zeigen in Übereinstimmung mit anderen klinischen Studien, dass die Entwicklung und die Funktionalität der HHN-Achse, welche am Ende der Schwangerschaft ausreift, sensibel auf inadäquate Glucocorticoidspiegel während der fetalen Reifungsphase reagiert. Sowohl pränataler Stress, als auch synthetische Glucocorticoide haben keinen unmittelbaren Einfluss auf die Reifungsgeschwindigkeit der fetalen HHN-Achse, sondern bewirken vor allem eine Sollwertverstellung mit Beeinflussung des negativen Feedback-Mechanismus, was zu einer Dysregulation der HHN-Achsenreaktivität führt. Eine Desensitivierung der HHN-Achse ist im späteren Leben mit neuropsychiatrische Erkrankungen wie Depressionen, Autismus und kognitiven Verhaltensauffälligkeiten assoziiert (Beydoun und Saftlas 2008, Glover et al. 2010, van den Bergh et al. 2008). Darüber hinaus werden auch kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen wie arterieller Hypertonus und Diabetes mellitus mit einer hyperaktiven HHN-Achse in Verbindung gebracht (Übersicht in: Harris und Seckl 2010).

Die Auswirkungen erhöhter Cortisolwerte durch pränatalen, maternalen Stress während der späten Schwangerschaft sind diesbezüglich vergleichbar mit denen einer Behandlung mit synthetischen Glucocorticoiden, obwohl der Transfer von endogenen Glucocorticoiden zum Fetus durch die plazentare Barriere stark eingeschränkt ist. Noch stärkere Effekte als später pränataler Stress weist pränataler Stress während der frühen Gestation auf, wenngleich zu diesem Zeitpunkt die zentralen Glucocorticoidrezeptoren noch nicht ausgereift sind. Dieser Befund deckt sich mit klinischen Untersuchungen am Menschen (van den Bergh et al. 2006).

Die Mechanismen, mit denen früher pränataler Stress auf den Fetus einwirkt bedürfen einer genaueren Untersuchung.

Zur weiteren Eingrenzung vulnerabler Zeitfenster während der Reifung der fetalen HHN-Achse bedarf es daher weiterführender tierexperimenteller Untersuchungen, bei denen insbesondere der Mechanismus einer vermuteten Desensitivierung zentraler Glucocorticoidrezeptoren durch epigenetische Mechanismen genauer erforscht werden sollte.

Darüber hinaus sind weitere retro- und vor allem prospektive Kohortenstudien notwendig um Rückschlüsse auf die Auswirkungen von pränatalem Stress auf die menschliche Entwicklung ziehen zu können. Hierzu existieren aktuell nur wenige Studien (van den Bergh et al. 2005, van den Bergh et al. 2008).

Da die vorliegenden Daten an einem biologisch relevanten Tiermodell erhoben wurden, können, wenn auch nur begrenzt, gewisse Rückschlüsse auf den Menschen gezogen werden.

Zu den Langzeitnebenwirkungen einer pränatalen Glucocorticoidbehandlung, wie sie zur Induktion der fetalen Lungenreifung eingesetzt wird, gibt es bereits erste Studien am Menschen. So wiesen Vorschulkinder, deren Mütter während der Schwangerschaft eine wiederholte Gabe von synthetischen Glucocorticoiden erhielten, Verhaltensauffälligkeiten und eine gestörte Kognition auf (French et al. 2004). Aus diesem Grunde sollte auf eine enge Indikationsstellung gegenüber einer pränatalen Glucocorticoidtherapie geachtet werden.

Darüber hinaus ist auf eine verminderte Stressexposition von Schwangeren auch während der Frühschwangerschaft zu achten. Als Ausgleich zu Stresssituationen können z. B. Entspannungstechniken wie progressive Muskelentspannung oder geführte Bilder Anwendung finden, welche u.a. eine Verringerung der fetalen Herzfrequenz und eine Beruhigung der fetalen Bewegungen bewirken (Fink et al. 2011). In wie weit diese Methoden jedoch positive Auswirkungen auf das Ungeborene haben muss noch erforscht werden.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

Abe H, Hidaka N, Kawagoe C, Odagiri K, Watanabe Y, Ikeda T, Ishizuka Y, Hashiguchi H, Takeda R, Nishimori T, Ishida Y. 2007. Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience research*, 59(2): 145-151.

Adams JH. 1975. Hypoxic brain damage. *British Journal of Anaesthesia*, 47(2): 121-129.

Alexander N, Rosenlöcher F, Stalder T, Linke J, Distler W, Morgner J, Kirschbaum C. Impact of antenatal synthetic glucocorticoid exposure on endocrine stress reactivity in term-born children. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97 (10): 3538-3544

Anderson AB, Gennser G, Jeremy JY, Ohrlander S, Sayers L, Turnbull AC. 1977. Placental transfer and metabolism of betamethasone in human pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 49(4): 471-474.

Antoni FA. 1986. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocrine Reviews*, 7(4): 351-378.

Asa SL, Kovacs K, Laszlo FA, Domokos I, Ezrin C. 1986. Human fetal adenohypophysis. Histologic and immunocytochemical analysis. *Neuroendocrinology*, 43(3): 308-316.

Asztalos E. 2012. Antenatal corticosteroids: a risk factor for the development of chronic disease. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012: 930591.

Axelrod L. 1976. Glucocorticoid therapy. *Medicine*, 55(1): 39-65.

Baker BL, Jaffe RB. 1975. The genesis of cell types in the adenohypophysis of the human fetus as observed with immunocytochemistry. *The American Journal of Anatomy*, 143(2): 137-161.

Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S. 1996. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *The Journal of Neuroscience*, 16(12): 3943-3949.

Barker DJ. 1998. In utero programming of chronic disease. *Clinical Science (London)*, 95(2): 115-128.

Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. 1993. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, 36(1): 62-67.

Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. 1997. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 46(2): 161-166.

Beversdorf DQ, Manning SE, Hillier A, Anderson SL, Nordgren RE, Walters SE, Nagaraja HN, Cooley WC, Gaelic SE, Bauman ML. 2005. Timing of prenatal stressors and autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 35(4): 471-478.

Beydoun H, Saftlas AF. 2008. Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 22(5): 438-466.

Blanford AT, Murphy BE. 1977. In vitro metabolism of prednisolone, dexamethasone, betamethasone, and cortisol by the human placenta. *American journal of obstetrics and gynecology*, 127(3): 264-267.

Braun T, Li S, Sloboda DM, Li W, Audette MC, Moss TJ, Matthews SG, Polglase G, Nitsos I, Newnham JP, Challis JR. 2009. Effects of maternal dexamethasone treatment in early pregnancy on pituitary-adrenal axis in fetal sheep. *Endocrinology*, 150(12): 5466-5477.

Brosnan PG. 2001. The hypothalamic pituitary axis in the fetus and newborn. *Seminars in Perinatology*, 25(6): 371-384.

- Brown AS, Susser ES, Lin SP, Neugebauer R, Gorman JM. 1995. Increased risk of affective disorders in males after second trimester prenatal exposure to the Dutch hunger winter of 1944-45. *The British Journal of Psychiatry : the Journal of Mental Science*, 166(5): 601-606.
- Brunton PJ. 2010. Resetting the dynamic range of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses through pregnancy. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(11): 1198-1213.
- Cerda S, Weitzman SA. 1997. Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutation Research*, 386(2): 141-152.
- Challis JR, Brooks AN. 1989. Maturation and activation of hypothalamic-pituitary adrenal function in fetal sheep. *Endocrine Reviews*, 10(2): 182-204.
- Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, Newnham J. 2001. The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 185(1-2): 135-144.
- Chrousos GP, Kino T. 2007. Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders. *Stress*, 10(2): 213-219.
- Clarke AS. 1996. Maternal gestational stress alters adaptive and social behavior in adolescent rhesus monkey offspring. *Infant Behavior and Development*, 19(4): 451-461.
- Dalziel SR, Parag V, Rodgers A, Harding JE. 2007. Cardiovascular risk factors at age 30 following pre-term birth. *International Journal of Epidemiology*, 36(4): 907-915.
- Dalziel SR, Lim VK, Lambert A, McCarthy D, Parag V, Rodgers A, Harding JE. 2005. Antenatal exposure to betamethasone: psychological functioning and health related quality of life 31 years after inclusion in randomised controlled trial. *British Medical Journal*, 331(7518): 665.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*, 19(3): 269-301.

de Weerth C, Buitelaar JK. 2005. Physiological stress reactivity in human pregnancy – a review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(2): 295-312.

Dessens AB, Haas HS, Koppe JG. 2000. Twenty-year follow-up of antenatal corticosteroid treatment. *Pediatrics*, 105(6): E77.

Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*, 3(1): 79-83.

Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW, Van Reeth O. 1999. High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. *Journal of Neuroscience*, 19(19): 8656-8664.

Fink NS, Urech C, Isabel F, Meyer A, Hoesli I, Bitzer J, Alder J. 2011. Fetal response to abbreviated relaxation techniques. A randomized controlled study. *Early Human Development*, 87(2): 121-127.

Fletcher AJ, Ma XH, Wu WX, Nathanielsz PW, McGarrigle HH, Fowden AL, Giussani DA. 2004. Antenatal glucocorticoids reset the level of baseline and hypoxemia-induced pituitary-adrenal activity in the sheep fetus during late gestation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 286(2): E311-319.

Frasch MG, Muller T, Wicher C, Weiss C, Lohle M, Schwab K, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2007. Fetal body weight and the development of the control of the cardiovascular system in fetal sheep. *Journal of Physiology*, 579(Pt 3): 893-907.

French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. 1999. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 180(1 Pt 1): 114-121.

French NP, Hagan R, Evans SF, Mullan A, Newnham JP. 2004. Repeated antenatal corticosteroids: effects on cerebral palsy and childhood behavior. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190(3): 588-595.

Giannakoulopoulos X, Teixeira J, Fisk N, Glover V. 1999. Human fetal and maternal noradrenaline responses to invasive procedures. *Pediatric Research*, 45(4 Pt 1): 494-499.

Gitau R, Cameron A, Fisk NM, Glover V. 1998. Fetal exposure to maternal cortisol. *Lancet*, 352(9129): 707-708.

Gitau R, Fisk NM, Teixeira JM, Cameron A, Glover V. 2001. Fetal hypothalamic-pituitary-adrenal stress responses to invasive procedures are independent of maternal responses. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(1): 104-109.

Glover V, O'Connor TG, O'Donnell K. 2010. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(1): 17-22.

Goldstein DS, Kopin IJ. 2008. Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathoneural responses to stressors: a meta-analysis. *Endocrine Regulations*, 42(4): 111-119.

Guerry JD, Hastings PD. 2011. In search of HPA axis dysregulation in child and adolescent depression. *Clinical Child and Family Psychology Review*, 14(2): 135-160.

Hagberg H, Mallard C. 2000. Antenatal brain injury: aetiology and possibilities of prevention. *Seminars in Neonatology* : SN, 5(1): 41-51.

Hall P. 2001. Actions of corticotropin on the adrenal cortex: Biochemistry and cell biology. In McEwen B Editor: *Coping with the Environment: Neural and Endocrine Mechanisms*. 4th edition. New York, Oxford University Press, 61-84.

Hanson MA. 1995. The control of heart rate and blood pressure in fetus: theoretical considerations. In: Hansen MA, Spencer JA, Rodeck CH, Editors. *Fetus and Neonate, Physiology and Clinical Applications*. First Edition: Cambridge University Press, 1-22.

Harris A, Seckl J. 2010. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Hormones and Behavior*, 59(3): 279-289.

Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N. 1998. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 16(3-4): 209-216.

Hennessy DP, Coghlan JP, Hardy KJ, Scoggins BA, Wintour EM. 1982. The origin of cortisol in the blood of fetal sheep. *The Journal of Endocrinology*, 95(1): 71-79.

Herman DB, Brown AS, Opler MG, Desai M, Malaspina D, Bresnahan M, Schaefer CA, Susser ES. 2006. Does unwantedness of pregnancy predict schizophrenia in the offspring? Findings from a prospective birth cohort study. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 41(8): 605-610.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(3): 151-180.

Holmes MC, Abrahamsen CT, French KL, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR. 2006. The mother or the fetus? 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(14): 3840-3844.

Huttunen MO, Niskanen P. 1978. Prenatal loss of father and psychiatric disorders. *Archives of General Psychiatry*, 35(4): 429-431.

Jensen Pena C, Monk C, Champagne FA. 2012. Epigenetic effects of prenatal stress on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain. *PLOS ONE (Public Library of Science)*, 7(6): e39791.

Jobe AH. 2003. Animal models of antenatal corticosteroids: clinical implications. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 46(1): 174-189.

Kajantie E, Raivio T, Janne OA, Hovi P, Dunkel L, Andersson S. 2004. Circulating glucocorticoid bioactivity in the preterm newborn after antenatal betamethasone treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(8): 3999-4003.

Kapoor A, Kostaki A, Janus C, Matthews SG. 2009. The effects of prenatal stress on learning in adult offspring is dependent on the timing of the stressor. *Behavioral Brain Research*, 197(1): 144-149.

Kinney DK, Miller AM, Crowley DJ, Huang E, Gerber E. 2008. Autism prevalence following prenatal exposure to hurricanes and tropical storms in Louisiana. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 38(3): 481-488.

Kutzler MA, Ruane EK, Coksaygan T, Vincent SE, Nathanielsz PW. 2004. Effects of three courses of maternally administered dexamethasone at 0.7, 0.75, and 0.8 of gestation on prenatal and postnatal growth in sheep. *Pediatrics*, 113(2): 313-319.

Law CM, Shiell AW, Newsome CA, Syddall HE, Shinebourne EA, Fayers PM, Martyn CN, de Swiet M. 2002. Fetal, infant, and childhood growth and adult blood pressure: a longitudinal study from birth to 22 years of age. *Circulation*, 105(9): 1088-1092.

Leonard BE. 2001a. Changes in the immune system in depression and dementia: causal or co-incident effects? *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19(3): 305-312.

Leonard BE. 2001b. The immune system, depression and the action of antidepressants. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(4): 767-780.

Liggins GC, Howie RN. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics*, 50(4): 515-525.

Loomans EM, van Dijk AE, Vrijkotte TG, van Eijsden M, Stronks K, Gemke RJ, Van den Bergh BR. 2012. Psychosocial stress during pregnancy is related to adverse birth outcomes: results from a large multi-ethnic community-based birth cohort. *European Journal of Public Health*.

Low JA. 2004. Determining the contribution of asphyxia to brain damage in the neonate. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 30(4): 276-286.

Lowry PJ, Estivariz FE, Gillies GE, Kruseman AC, Linton EA. 1986. CRF: its regulation of ACTH and pro-opiomelanocortin peptide release and its extra hypothalamic occurrence. *Acta Endocrinologica. Supplementum*, 276: 56-62.

Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C, Van Reeth O. 2003. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1-2): 119-127.

Marinelli M, Rudick CN, Hu XT, White FJ. 2006. Excitability of dopamine neurons: modulation and physiological consequences. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 5(1): 79-97.

Matthews SG. 2002. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13(9): 373-380.

Matthews SG, Yang K, Challis JR. 1995. Changes in glucocorticoid receptor mRNA in the developing ovine pituitary and the effects of exogenous cortisol. *The Journal of Endocrinology*, 144(3): 483-490.

McMillen IC, Robinson JS. 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological Reviews*, 85(2): 571-633.

Mesiano S, Jaffe RB. 1997. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocrine Reviews*, 18(3): 378-403.

Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. 1992. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*, 257(5074): 1248-1251.

Mueller BR, Bale TL. 2008. Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(36): 9055-9065.

Munck A, Naray-Fejes-Toth A. 1992. The ups and downs of glucocorticoid physiology. Permissive and suppressive effects revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 90(1): C1-4.

Myhrman A, Rantakallio P, Isohanni M, Jones P, Partanen U. 1996. Unwantedness of a pregnancy and schizophrenia in the child. *The British Journal of Psychiatry : the Journal of Mental Science*, 169(5): 637-640.

Nader N, Chrousos GP, Kino T. 2010. Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 21(5): 277-286.

Nemeroff CB, Owens MJ. 2004. Pharmacologic differences among the SSRIs: focus on monoamine transporters and the HPA axis. *CNS Spectrums*, 9(6 Suppl 4): 23-31.

Newnham JP, Moss TJ. 2001. Antenatal glucocorticoids and growth: single versus multiple doses in animal and human studies. *Seminars in Neonatology*, 6(4): 285-292.

Niederhofer H, Reiter A. 2004. Prenatal maternal stress, prenatal fetal movements and perinatal temperament factors influence behavior and school marks at the age of 6 years. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 19(2): 160-162.

Niezgoda, J., Wronska, D., Pierzchala, K., Bobek, S., Kahl, S., 1987. Lack of adaptation to repeated emotional stress evoked by isolation of sheep from the flock. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 34, 734–739.

Noorlander CW, De Graan PN, Middeldorp J, Van Beers JJ, Visser GH. 2006. Ontogeny of hippocampal corticosteroid receptors: effects of antenatal glucocorticoids in human and mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 499(6): 924-932.

- Nuyt AM. 2008. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clinical Science*, 114(1): 1-17.
- O'Connor TG, Heron J, Glover V. 2002. Antenatal anxiety predicts child behavioral/emotional problems independently of postnatal depression. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 41(12): 1470-1477.
- O'Donnell KJ, Bugge Jensen A, Freeman L, Khalife N, O'Connor TG, Glover V. 2012. Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11beta-HSD2. *Psychoneuroendocrinology*, 37(6): 818-826.
- Pariante C, Miller A. 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biological Psychiatry*, 49: 391-404.
- Polyakov A, Cohen S, Baum M, Trickey D, Jolley D, Wallace EM. 2007. Patterns of antenatal corticosteroid prescribing 1998-2004. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 47(1): 42-45.
- Reul JM, de Kloet ER. 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117(6): 2505-2511.
- Rose JC, Kute TE, Winkler L. 1985. Glucocorticoid receptors in sheep brain tissues during development. *The American Journal of Physiology*, 249(4 Pt 1): E345-349.
- Roussel S, Hemsworth PH, Boissy A, Duvaux-Ponter C. 2004. Effects of repeated stress during pregnancy in ewes on the behavioural and physiological responses to stressful events and birth weight of their offspring. *Applied Animal Behaviour Science*, 85(3-4): 259-276.
- Sarkar P, Bergman K, O'Connor TG, Glover V. 2008. Maternal antenatal anxiety and amniotic fluid cortisol and testosterone: possible implications for foetal programming. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(4): 489-496.

Schwab M, Coksaygan T, Rakers F, Nathanielsz PW. 2012. Glucocorticoid exposure of sheep at 0.7 to 0.75 gestation augments late-gestation fetal stress responses. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(3): 253 e216-222.

Schwab M, Roedel M, Anwar MA, Muller T, Schubert H, Buchwalder LF, Walter B, Nathanielsz W. 2000. Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *The Journal of Physiology*, 528(Pt 3): 619-632.

Seckl JR, Meaney MJ. 2004. Glucocorticoid programming. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1032: 63-84.

Sloboda DM, Moss TJ, Gurrin LC, Newnham JP, Challis JR. 2002. The effect of prenatal betamethasone administration on postnatal ovine hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Journal of Endocrinology*, 172(1): 71-81.

Sloboda DM, Moss TJ, Li S, Matthews SG, Challis JR, Newnham JP. 2008. Expression of glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor, and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 in the fetal and postnatal ovine hippocampus: ontogeny and effects of prenatal glucocorticoid exposure. *Journal of Endocrinology*, 197(2): 213-220.

Sloboda DM, Moss TJ, Li S, Doherty D, Nitsos I, Challis JR, Newnham JP. 2007. Prenatal betamethasone exposure results in pituitary-adrenal hyporesponsiveness in adult sheep. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 292(1): E61-70.

Son GH, Geum D, Chung S, Kim EJ, Jo JH, Kim CM, Lee KH, Kim H, Choi S, Kim HT, Lee CJ, Kim K. 2006. Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(12): 3309-3318.

Stevens AD, Lumbers ER. 1995. Effects of intravenous infusions of noradrenaline into the pregnant ewe on uterine blood flow, fetal renal function, and lung liquid flow. *Canadian journal of Physiology and Pharmacology*, 73(2): 202-208.

Stott D. 1973. Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 17(6): 770-787.

Stratakis CA, Chrousos GP. 1995. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 771: 1-18.

Tangalakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM. 1992. Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Experimental Physiology*, 77(5): 709-717.

Tangalakis K, Coghlan JP, Connell J, Crawford R, Darling P, Hammond VE, Haralambidis J, Penschow J, Wintour EM. 1989. Tissue distribution and levels of gene expression of three steroid hydroxylases in ovine fetal adrenal glands. *Acta Endocrinologica*, 120(2): 225-232.

Tegethoff M, Pryce C, Meinschmidt G. 2009. Effects of intrauterine exposure to synthetic glucocorticoids on fetal, newborn, and infant hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in humans: a systematic review. *Endocrine Reviews*, 30(7): 753-789.

Thakor AS, Herrera EA, Seron-Ferre M, Giussani DA. 2010. Melatonin and vitamin C increase umbilical blood flow via nitric oxide-dependent mechanisms. *Journal of Pineal Research*, 49(4): 399-406.

Thliveris JA, Currie RW. 1980. Observations on the hypothalamo-hypophyseal portal vasculature in the developing human fetus. *The American Journal of Anatomy*, 157(4): 441-444.

Turner JD, Alt SR, Cao L, Vernocchi S, Trifonova S, Battello N, Muller CP. 2010. Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochemical Pharmacology*, 80(12): 1860-1868.

Ulrich-Lai YM, Engeland WC. 2002. Adrenal splanchnic innervation modulates adrenal cortical responses to dehydration stress in rats. *Neuroendocrinology*, 76(2): 79-92.

Unno N, Wong CH, Jenkins SL, Wentworth RA, Ding XY, Li C, Robertson SS, Smotherman WP, Nathanielsz PW. 1999. Blood pressure and heart rate in the ovine fetus: ontogenic changes and effects of fetal adrenalectomy. *American Journal of Physiology*, 276(1 Pt 2): H248-256.

van den Bergh BR, Mulder EJ, Mennes M, Glover V. 2005. Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(2): 237-258.

van den Bergh BR, van Calster B, Smits T, van Huffel S, Lagae L. 2008. Antenatal maternal anxiety is related to HPA-axis dysregulation and self-reported depressive symptoms in adolescence: a prospective study on the fetal origins of depressed mood. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(3): 536-545.

van den Bergh BR, Mennes M, Stevens V, van der Meere J, Borger N, Stiers P, Marcoen A, Lagae L. 2006. ADHD deficit as measured in adolescent boys with a continuous performance task is related to antenatal maternal anxiety. *Pediatric Research*, 59(1): 78-82.

van Os J, Selten JP. 1998. Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands. *The British Journal of Psychiatry : the Journal of Mental Science*, 172: 324-326.

Vazquez DM. 1998. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*, 23(7): 663-700.

Vierin M, Bouissou MF. 2001. Pregnancy is associated with low fear reactions in ewes. *Physiology & Behavior*, 72(4): 579-587.

Walker E, Mittal V, Tessner K. 2008. Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annual Review of Clinical Psychology*, 4: 189-216.

Ward AJ. 1990. A comparison and analysis of the presence of family problems during pregnancy of mothers of "autistic" children and mothers of normal children. *Child Psychiatry and Human Development*, 20(4): 279-288.

Watson JB, Mednick SA, Huttunen M, Wang X. 1999. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Development and Psychopathology*, 11(3): 457-466.

Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. 2000. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *European Journal of Neuroscience*, 12(3): 1047-1054.

Whitnall MH. 1993. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Progress in Neurobiology*, 40(5): 573-629.

Wintour EM, Crawford R, McFarlane A, Moritz K, Tangalakakis K. 1995. Regulation and function of the fetal adrenal gland in sheep. *Endocrine Research*, 21(1-2): 81-89.

Wood CE. 1986. ACTH, cortisol, and renin responses to arterial hypotension in sheep. *The American Journal of Physiology*, 251(1 Pt 2): R18-22.

Yang K, Jones SA, Challis JR. 1990. Changes in glucocorticoid receptor number in the hypothalamus and pituitary of the sheep fetus with gestational age and after adrenocorticotropin treatment. *Endocrinology*, 126(1): 11-17.

Anhang

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schwab und
- Herrn Dr. Harald Schubert

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Berlin, 23.10.2012

Vilmar Frauendorf

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schwab für die Überlassung des Themas sowie die fachliche und organisatorische Betreuung dieser Arbeit. Seine fachliche und menschliche Begleitung während der zum Teil sehr kräfteaubenden Versuchsabschnitte, sowie seine Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts ermöglichte erst die Fertigstellung dieser Arbeit.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Harald Schubert für die Bereitstellung der Versuchsanordnung und für seine tatkräftige Mithilfe bei der Umsetzung der Versuche.

Mein besonderer Dank gilt dem Team des Instituts für Versuchstierkunde sowie den Mitarbeitern des Friedrich-Loeffler-Instituts für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Sowohl das familiäre Miteinander als auch die große Hilfsbereitschaft bleiben mir in guter Erinnerung.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines IZKF-Stipendiums während der Versuchsphase möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Witte, sowie der Geschäftsführung bedanken.

Einen außerordentlichen Dank möchte ich an Florian Rakers aussprechen, auf den als Kollege und als Freund stets Verlass war.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, für ihre Rücksicht und motivierende Unterstützung.